



Guilherme Ribeiro Torres Pereira

Licenciado em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Avaliação do crescimento da macrófita
Lemna minor L. e da microalga *Chlorella
vulgaris* Beijerinck (Beijerinck), numa água
residual proveniente da ETAR da Quinta do
Conde**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia do Ambiente,
Perfil de Engenharia Sanitária

Orientador: Professor Doutor António Manuel Fernandes
Rodrigues, Professor Auxiliar da UNL/FCT

Coorientador: Professor Doutor Michiel Adriaan Daam, Professor
Auxiliar da UNL/FCT

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Arguente: Prof.^a Doutora Rita Maurício Rodrigues Rosa

Vogais: Prof. Doutor Pedro Manuel da Hora Santos Coelho

Prof. Doutor Michiel Daam

Copyrighted © Guilherme Ribeiro Torres Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologias, Universidade Nova de Lisboa. A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Agradecimentos

Tenho de agradecer ao Professor Doutor António Rodrigues e ao Professor Doutor Michiel Daam pela disponibilidade e paciência em me orientarem e por me transmitirem os conhecimentos e disponibilizarem os meios necessários para a realização desta dissertação.

Agradeço à D^a. Luísa e à D^a. Adélia pelo apoio prestado a nível laboratorial, sem o qual não teria sido possível obter os resultados constantes deste trabalho.

Fico agradecido à SIMARSUL, nomeadamente à Eng^a. Cristina Santos e ao Eng^o. Nuno Soares, pela disponibilidade em fornecer o efluente e os dados necessários à realização deste trabalho.

A conclusão do meu percurso académico não seria possível sem o apoio incondicional dos meus pais e namorada, a quem devo gratidão e respeito.

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do crescimento da macrófita *Lemna minor* e da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual proveniente de uma dada estação de tratamento de águas residuais. Além das espécies mencionadas foi utilizada uma terceira espécie, o microcrustáceo *Daphnia magna*, com o objetivo de investigar a sua interação com a *L. minor* e com a *C. vulgaris*, de forma a avaliar as interações tróficas por meio de testes multiespécie. Foram utilizadas várias concentrações de água residual, com o intuito de analisar a sua influência no crescimento das espécies usadas em cada ensaio.

Neste estudo foi, também, desenvolvido um sistema de classificação das ETAR, com vista a determinar qual a que possui o efluente com as características mais apropriadas, para a realização dos ensaios laboratoriais. Foram consideradas todas as ETAR geridas pela SIMARSUL, tendo sido selecionada a ETAR da Quinta do Conde, por apresentar a classificação mais elevada.

No âmbito deste trabalho foram realizados três ensaios: o ensaio preliminar, o 1º ensaio e o 2º ensaio. Em cada ensaio foram previamente estabelecidos diferentes parâmetros, como por exemplo a intensidade luminosa e temperatura, para amostras com várias concentrações de água residual.

Quando se comparou a evolução das taxas de crescimento específico em termos do aumento da concentração da água residual nas amostras, observou-se uma evolução oposta para a *L. minor* e *C. vulgaris*. A taxa de crescimento específico da *L. minor*, quer em termos do número de frondes, quer da área foliar, diminuiu com o aumento da concentração da água residual nas amostras, enquanto no caso da *C. vulgaris*, a taxa de crescimento específico aumentou. Estes resultados evidenciam o efeito tóxico desta água residual na *L. minor*.

A presença da *D. magna* nas amostras não afetou, significativamente, a taxa de crescimento específico da *L. minor* e da *C. vulgaris*.

Os resultados anteriores confirmam, a adequação da *L. minor* como organismo teste em testes ecotoxicológicos, e o potencial da *C. vulgaris* para aplicações futuras envolvendo processos de biorremediação nas ETAR.

Palavras-chave: Taxa de crescimento específico; *Lemna minor*; *Chlorella vulgaris*; *Daphnia magna*; macrófitas; microalgas; água residual

ABSTRACT

The main objective of this work was to evaluate the growth of the macrophyte *Lemna minor* and the microalgae *Chlorella vulgaris* in wastewater from a local Portuguese wastewater treatment plant (WWTP). In addition to these species, a third species was used, the freshwater crustacean *Daphnia magna*, which was included to evaluate its trophic interactions with *L. minor* and *C. vulgaris*. Various concentrations of wastewater were considered in order to analyse its influence on the population growth of the species used in each test.

A classification system was developed to determine which of the WWTPs in the Setúbal Península would deliver the wastewater with the required characteristics for the tests. All operational wastewater treatment plants, managed by SIMARSUL, were considered. The wastewater treatment plant of Quinta do Conde obtained the highest classification and was therefore selected.

Within the scope of this work, three tests were carried out: a preliminary test and the two final tests. In each test, several environmental parameters were evaluated, namely light intensity and temperature, for samples with different wastewater concentrations.

When comparing the evolution of the specific average growth rates, in relation to the concentration of wastewater in the treatments, an opposite trend was observed for *L. minor* and *C. vulgaris*. The growth rate of *L. minor* decreased with increasing concentration of wastewater in the samples, when considering the number of fronds as well as the leaf area, whereas the growth rate of *C. vulgaris* increased. These results show a toxicity effect of the wastewater for the *L. minor*.

The presence of *D. magna* in the samples did not significantly affect the growth rate of *L. minor* and *C. vulgaris*.

The previous results confirm the suitability of *L. minor* as a test organism in ecotoxicological tests and the potential of *C. vulgaris* for future application in nutrient bioremediation in WWTPs.

Keywords: Specific growth rate; *Lemna minor*; *Chlorella vulgaris*; *Daphnia magna*; macrophytes; microalgae; wastewater

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Relevância científica | 1 |
| 1.2 Objetivos | 4 |
| 1.3 Organização da Dissertação | 4 |
| 2. Revisão bibliográfica | 5 |
| 2.1 Diretiva Quadro de Água | 5 |
| 2.2 Instrumentos legais para controlo da água residual disponíveis em Portugal | 5 |
| 2.3 Tratamento convencional da água residual doméstica | 7 |
| 2.4 Macrófitas e microalgas para o tratamento de águas residuais | 8 |
| 2.5 Testes de toxicidade | 12 |
| 2.6 Organismos utilizados em testes de toxicidade | 15 |
| 3. Materiais e métodos | 17 |
| 3.1 Processo de seleção da ETAR mais adequada ao sistema de fitorremediação | 17 |
| 3.2 Caracterização da ETAR da Quinta do Conde | 24 |
| 3.3 Organismos utilizados e meio de cultura | 28 |
| 3.3.1 Organismos utilizados | 28 |
| 3.3.2 Meio de cultura | 30 |
| 3.4 Água residual utilizada nos ensaios | 32 |
| 3.4.1 Amostragem da água residual | 32 |
| 3.4.2 Caracterização da água residual doméstica | 32 |
| 3.5 Metodologia geral dos ensaios | 32 |
| 3.6 Ensaio toxicológico | 34 |
| 3.7 Parâmetros de avaliação – <i>Lemna minor</i> | 35 |
| 3.7.1 Número de frondes | 36 |
| 3.7.2 Área foliar | 37 |
| 3.8 Parâmetros de avaliação – <i>Chlorella vulgaris</i> | 37 |
| 3.8.1 Absorvência | 37 |
| 3.9 Procedimento experimental nos ensaios | 38 |
| 3.10 Determinação de fósforo total e azoto total nos ensaios realizados | 40 |
| 3.11 Análise Estatística | 41 |
| 4. Resultados e discussão | 43 |
| 4.1 Ensaio Preliminar | 43 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 4.2 | 1º Ensaio..... | 43 |
| 4.2.1 | Temperatura e pH..... | 43 |
| 4.2.2 | Clorofila <i>a</i> | 44 |
| 4.2.3 | Taxas de crescimento específico | 49 |
| 4.3 | 2º Ensaio..... | 56 |
| 4.3.1 | Temperatura e pH..... | 56 |
| 4.3.2 | Clorofila <i>a</i> | 60 |
| 4.3.3 | Taxas de crescimento específico | 62 |
| 4.4 | Concentração de fósforo total e azoto total das amostras no final dos ensaios e respectivas eficiências de remoção | 73 |
| 4.4.1 | Concentração de fósforo total e azoto total no 1º Ensaio | 73 |
| 4.4.2 | Eficiências de remoção de fósforo total e azoto total no 1º Ensaio | 74 |
| 4.4.3 | Concentração de fósforo total e azoto total no 2º Ensaio | 75 |
| 4.4.4 | Eficiências de remoção de fósforo total e azoto total no 2º Ensaio | 75 |
| 4.5 | Discussão integrada dos resultados..... | 75 |
| 5. | Conclusões e perspectivas de trabalho futuro | 81 |
| 6. | Referências bibliográficas | 85 |
| 7. | ANEXOS | 103 |
| 7.1 | Anexo I - Diagrama Linear esquematizado do tratamento da fase líquida e da fase sólida na ETAR da Quinta do Conde | 103 |
| 7.2 | Anexo II – Tabelas de valores da reta de calibração, clorofila <i>a</i> , taxa de crescimento específico e desvio padrão da <i>Chlorella vulgaris</i> | 105 |
| 7.3 | Anexo III – Tabelas de valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico da <i>Lemna minor</i> | 109 |
| 7.4 | Anexo IV – Tabelas de valores para a temperatura, pH, absorvência, nº de <i>Daphnia</i> e taxas de crescimento específico da <i>Daphnia</i> | 115 |
| 7.5 | Anexo V –Tabela de valores para a concentração de fósforo total e azoto total no final do ensaio preliminar | 119 |
| 7.6 | Anexo VI – Tabela de valores para a caracterização do efluente final | 121 |
| 7.7 | Anexo VII – Tabelas de valores obtidos no software R para o teste de Tukey..... | 123 |
| 7.8 | Anexo VIII – Script utilizado no software R para a análise estatística..... | 127 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 - Mapa representativo do stress hídrico mundial em 1995 e previsto para 2025 . | 1 |
| Figura 1.2 - Rácio das águas residuais tratadas (azul) e não tratadas (laranja) em 11 regiões do mundo. | 2 |
| Figura 3.1 - ETAR da Quinta do Conde. | 24 |
| Figura 3.2 - Implantação esquemática da ETAR da Quinta do Conde. | 25 |
| Figura 3.3 - Diagrama Linear esquematizando o tratamento da fase líquida e da fase sólida na ETAR da Quinta do Conde. | 26 |
| Figura 3.4 - Erlenmeyer com quatro plantas de <i>L. minor</i> . | 28 |
| Figura 3.5 - Erlenmeyer com <i>C. vulgaris</i> . | 29 |
| Figura 3.6 - Erlenmeyer com <i>D. magna</i> . Imagem aumentada da <i>D. magna</i> no canto superior direito | 29 |
| Figura 3.7 - Delimitação do número de frondes no software ImageJ. | 36 |
| Figura 3.8 - Imagem da tabela com os resultados obtidos com o software ImageJ para o número de frondes e área foliar (cm ²). | 37 |
| Figura 3.9 - Reta de calibração entre a absorvência e concentração de clorofila <i>a</i> . | 38 |
| Figura 4.1 - Evolução da temperatura ao longo dos sete dias de ensaio. | 44 |
| Figura 4.2 - Valores do pH ao longo de 7 dias para as amostras com <i>L. minor</i> (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 45 |
| Figura 4.3 - Valores de pH ao longo do ensaio para <i>C. vulgaris</i> (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 46 |
| Figura 4.4 - Concentração média de clorofila <i>a</i> ao longo do tempo para <i>C. vulgaris</i> e várias concentrações de água residual. | 47 |
| Figura 4.5 - Valores da concentração de clorofila <i>a</i> ao longo de 7 dias para as amostras com <i>C. vulgaris</i> (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 48 |
| Figura 4.6 - Taxa de crescimento específico da <i>L. minor</i> para o número de frondes e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 49 |
| Figura 4.7 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes. | 51 |
| Figura 4.8 - Yield do número de frondes para a <i>L. minor</i> e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 52 |
| Figura 4.9 - Taxa de crescimento específico da <i>L. minor</i> para a área foliar e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 52 |
| Figura 4.10 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para as taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar. | 54 |
| Figura 4.11 - Yield da área foliar para a <i>L. minor</i> e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 55 |
| Figura 4.12 - Taxa de crescimento específico da <i>C. vulgaris</i> para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.13 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para a <i>C. vulgaris</i> | 57 |
| Figura 4.14 - Evolução da temperatura ambiente ao longo do ensaio. | 58 |
| Figura 4.15 - Valores do pH ao longo de 7 dias para as amostras com <i>L. minor</i> (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 59 |
| Figura 4.16 - Erlenmeyer com amostra de controlo com <i>L. minor</i> . A-Início do ensaio; B- Final do ensaio (7dias); | 59 |
| Figura 4.17 - Valores do pH para as amostras do 2º ensaio com <i>C. vulgaris</i> | 60 |
| Figura 4.18 - Valores de pH para as amostras com <i>D. magna</i> e uma concentração de água residual de 25% (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 61 |
| Figura 4.19 - Concentrações de clorofila <i>a</i> ao longo do tempo para <i>C. vulgaris</i> e várias concentrações de água residual. | 62 |
| Figura 4.20 - Valores da concentração de clorofila <i>a</i> para as amostras com <i>C. vulgaris</i> (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 63 |
| Figura 4.21 - Taxa de crescimento específico para o número de frondes, envolvendo a <i>L. minor</i> para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 64 |
| Figura 4.22 - Comparação gráfica entre pares de amostras do intervalo de confiança associado ao teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes (<i>L-Lemna</i> ; <i>D-Daphnia</i> ; <i>C-Chlorella</i>)..... | 65 |
| Figura 4.23 - Yield do número de frondes envolvendo a <i>L. minor</i> , para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 66 |
| Figura 4.24 - Taxa de crescimento específico da <i>L. minor</i> envolvendo a área foliar para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 67 |
| Figura 4.25 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar (<i>L-Lemna</i> ; <i>D-Daphnia</i> ; <i>C-Chlorella</i>). | 68 |
| Figura 4.26 - Yield para a área foliar envolvendo a <i>L. minor</i> para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 69 |
| Figura 4.27 - Taxas de crescimento específico envolvendo a <i>C. vulgaris</i> para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 69 |
| Figura 4.28 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para as taxas de crescimento específico obtidas para a <i>C. vulgaris</i> (<i>L-Lemna</i> ; <i>D-Daphnia</i> ; <i>C-Chlorella</i>). | 71 |
| Figura 4.29 - Evolução do número de <i>D. magna</i> ao longo do ensaio para concentrações de 25% de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 72 |
| Figura 4.30 - Taxa de crescimento específico da <i>D. magna</i> ao fim de 7 dias (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras). | 72 |
| Figura 4.31 - Taxas de crescimento específico para a amostra com a concentração de 25% de água residual para as espécies <i>L. minor</i> , <i>D. magna</i> e <i>C. vulgaris</i> | 73 |
| Figura 4.32 - Taxas de crescimento específico de <i>C. vulgaris</i> e <i>L. minor</i> (em termos do número de frondes) no 1º ensaio para várias concentrações de água residual. | 76 |

| | |
|---|----|
| Figura 4.33 - Taxas de crescimento específico da <i>C. vulgaris</i> e <i>L. minor</i> (em termos do número de frondes) no 2º ensaio, para as amostras de controlo e concentrações de 12,5% e 25% de água residual. | 77 |
| Figura 4.34 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a <i>C. vulgaris</i> nas amostras de controlo..... | 77 |
| Figura 4.35 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a <i>C. vulgaris</i> nas amostras com a concentração de 25% de água residual..... | 78 |
| Figura 4.36 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a <i>L. minor</i> em termos da área foliar, nas amostras com a concentração de 25% de água residual. | 79 |
| Figura 4.37 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a <i>L. minor</i> em termos do número de frondes, nas amostras com a concentração de 25% de água residual. | 79 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 - Requisitos para as descargas das ETAR urbanas..... | 7 |
| Tabela 3.1 - Peso atribuído a cada um dos parâmetros..... | 17 |
| Tabela 3.2 - Escala de pontuação para a população equivalente (habitantes)..... | 18 |
| Tabela 3.3 -Escala de pontuação para a distância FCT/ETAR..... | 18 |
| Tabela 3.4 - Escala de pontuação para a microtamização..... | 19 |
| Tabela 3.5 - Escala de pontuação para a condutividade média do efluente final..... | 19 |
| Tabela 3.6 - Escala de pontuação para a informação disponível sobre a ETAR..... | 20 |
| Tabela 3.7 - Escala de pontuação para a concentração média de CQO no efluente final..... | 20 |
| Tabela 3.8 - Escala de pontuação para o rácio N:P..... | 21 |
| Tabela 3.9 - Escala de pontuação para a implementação do sistema de produção de biomassa..... | 21 |
| Tabela 3.10 - Pontuação de cada parâmetro por ETAR..... | 22 |
| Tabela 3.11 - Classificação das ETAR..... | 23 |
| Tabela 3.12 - Resultados para as três ETAR mais bem classificadas..... | 24 |
| Tabela 3.13 - Fases de tratamento da ETAR..... | 27 |
| Tabela 3.14 - Composição e respetivas concentrações do meio de cultura da <i>L. minor</i> | 30 |
| Tabela 3.15 - Composição do meio de cultura Bold Basal modificado..... | 31 |
| Tabela 3.16 - Valores referentes aos efluentes utilizados nos ensaios..... | 32 |
| Tabela 3.17 - Objetivos dos ensaios realizados..... | 33 |
| Tabela 3.18 - Resumo das condições pré-restabelecidas comuns aos vários ensaios..... | 39 |
| Tabela 3.19 - Resumo dos procedimentos específicos para as várias amostras..... | 41 |
| Tabela 4.1 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com <i>L.minor</i> , envolvendo o número de frondes..... | 50 |
| Tabela 4.2 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com <i>L.minor</i> , envolvendo a área foliar..... | 53 |
| Tabela 4.3 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com <i>C.vulgaris</i> | 56 |
| Tabela 4.4 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com <i>L.minor</i> , envolvendo o número de frondes..... | 64 |
| Tabela 4.5 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com <i>L.minor</i> , envolvendo a área foliar..... | 67 |
| Tabela 4.6 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com <i>C.vulgaris</i> | 70 |
| Tabela 4.7 - Valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 1º ensaio, para várias concentrações de água residual..... | 74 |
| Tabela 4.8 - Eficiências de remoção para a <i>L. minor</i> e <i>C. vulgaris</i> em 100% de água residual..... | 74 |
| Tabela 4.9 - Valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 2º ensaio..... | 75 |

Abreviaturas e acrónimos

CBO – Carência bioquímica de oxigénio

CBO₅ – Carência bioquímica de oxigénio ao fim de 5 dias

CE – Concentração efetiva

CE₅₀ – Concentração efetiva para 50% da população

CENO – Concentração do efeito não observado

CEO – Concentração do efeito observado

CF – Coliformes fecais

CL – Concentração letal

CL₅₀ – Concentração letal para 50% da população

CQO – Carência química de oxigénio

DE – Dose efetiva

DE₅₀ – Dose efetiva para 50% da população

DL – Dose letal

DL₅₀ – Dose letal para 50% da população

DQA – Diretiva Quadro de Água

ETA – Estação de tratamento de água

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

HB – Hemoglobina

METHB – Metahemoglobina

NMP – Número mais provável

NO_x – Óxidos de azoto

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

SST – Sólidos suspensos totais

UV – Ultravioleta

WLC – Combinação linear ponderada

1. Introdução

1.1 Relevância científica

De acordo com as últimas estimativas das Nações Unidas, a população mundial atual é de 7,8 mil milhões, prevendo-se que chegue aos 8,5 mil milhões em 2030, 9,7 mil milhões em 2050 e 10,9 mil milhões em 2100 (United Nations, 2019a, 2019b). As alterações climáticas e a procura do recurso água fazem com que seja necessária uma gestão adequada deste recurso. Além do aumento da evaporação, devido ao aquecimento global, as alterações climáticas poderão potenciar a ocorrência e a intensidade de cheias e secas. As atividades antropogénicas frequentemente têm como consequência a contaminação dos poucos recursos aquáticos ainda prístinos, acentuando os efeitos das alterações climáticas (Makarigakis & Jimenez-Cisneros, 2019).

O crescimento urbano e a alteração do clima, entre outros problemas, podem acentuar a proliferação de espécies como algas, levando à alteração da qualidade associada à origem da água, tornando-se um fenómeno global. Desta forma, os reservatórios urbanos eutrofizados constituem problemas de saúde pública e ambiental, tendo em consideração o risco que apresentam para a saúde da população (Oliver et al., 2018).

Presentemente, é reconhecido universalmente que a água doce e a sua gestão sustentável é uma das mais importantes preocupações de vários grupos científicos, sociais e políticos. Contudo, o recurso água encontra-se alvo de diversas ameaças quantitativas e qualitativas. A poluição e o crescimento populacional, industrialização e rápido desenvolvimento económico, infligem riscos severos em termos da disponibilidade e qualidade dos recursos aquáticos em diversas partes do globo.

Os mapas-múndi representados na Figura 1.1 evidenciam o impacto do crescimento populacional, entre 1995 e o previsto para 2025, no uso da água, tendo em conta a taxa do uso da água por pessoa.

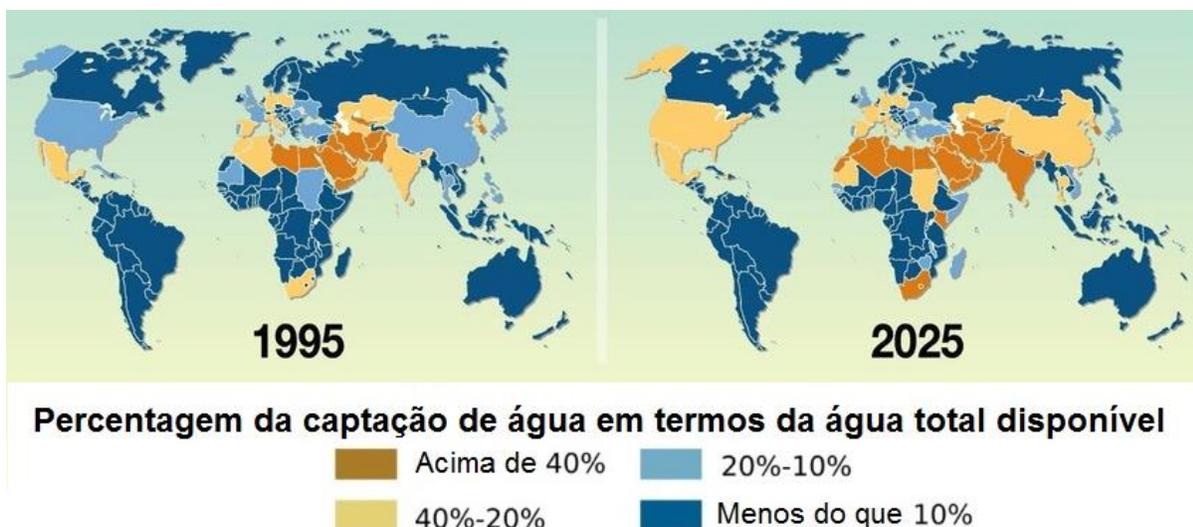


Figura 1.1 - Mapa representativo do stress hídrico mundial em 1995 e previsto para 2025 (Rekacewicz, 2012).

É possível observar na Figura 1.1, um aumento do impacto do crescimento populacional em 2025, em relação ao período de 1995. A redução da disponibilidade dos recursos de água doce e, a qualidade da água são das principais preocupações mundiais. Nos dias de hoje, está provado que as atividades antropogênicas são a principal causa da poluição e alteração do ambiente. Estas atividades, necessárias ao desenvolvimento humano, levam à degradação do ambiente e à libertação de materiais tóxicos, sendo responsáveis pela perda de qualidade de vida. Um dos problemas mais graves é a poluição da água, causada por diferentes atividades humanas como a industrial, agrícola e doméstica.

A maior causa de poluição das massas de água é a descarga de efluentes não tratados de forma adequada, que adiciona agentes patogênicos, compostos orgânicos e inorgânicos e poluentes macroscópicos aos corpos de água (Pandey, 2006). Assim, para se descarregarem efluentes industriais, agrícolas e domésticos sem causar danos à saúde humana ou ao ambiente natural, é necessário tratar as águas residuais de modo a remover, e.g., nutrientes, organismos patogênicos e metais pesados, até se atingirem concentrações que cumpram os valores de segurança previamente estabelecidos. O rácio de água tratada e não tratada em várias regiões do mundo está representado na Figura 1.2.



Figura 1.2 - Rácio das águas residuais tratadas (azul) e não tratadas (laranja) em 11 regiões do mundo (Ahlenius, 2010).

A água residual não tratada ou tratada de forma deficiente pode originar problemas ambientais, como por exemplo a eutrofização das massas de água. A eutrofização consiste na adição de nutrientes, como azoto e fósforo, a um ecossistema aquático, resultando no aumento da produtividade primária, e podendo ter efeitos dramáticos nesse ecossistema. Os níveis elevados de nutrientes promovem um crescimento excessivo de algas. Quando as algas morrem, a sua decomposição por bactérias leva à depleção do oxigénio na água, o que faz com que haja um declínio de outros organismos aquáticos (Sadava et al., 2009).

A introdução de azoto no ambiente tem aumentado bastante nos últimos anos. A poluição devido ao azoto leva a acidificação dos solos e da água, perda de biodiversidade em ecossistemas aquáticos e terrestres, e eutrofização das massas de água. O azoto amoniacal nas águas de superfície é tóxico para os peixes,

enquanto que o azoto na água de consumo, pode levar a problemas de saúde, de entre os quais o mais conhecido é a metahemoglobinemia. Este problema de saúde é caracterizado pela presença de níveis elevados de metahemoglobina (METHB) que resulta da presença de ferro na forma férrica em vez da forma usual de ferro (metahemoglobinemia), tendo como consequência uma diminuição do oxigénio disponível para os tecidos, o que pode ser devido a redução de nitrato a nitrito no organismo humano (Fernícola & Azevedo, 1981; Fewtrell, 2004).

Outro efeito prejudicial do azoto, na forma de óxidos de azoto (NO_x), é a sua contribuição para a formação de ozono na troposfera, levando à diminuição da produtividade das florestas e das culturas agrícolas, bem como a problemas de saúde humana (Cristovão, 2016; Bhatia et al., 2012). Adicionalmente, o azoto na forma de amoníaco e NO_x , pode ser libertado para a atmosfera contribuindo para a formação de chuvas ácidas (Cristovão, 2016; Liu et al., 2019; Brusseau et al., 2019).

A transferência da água captada de uma determinada origem para a estação de tratamento de água (ETA), a distribuição da água desde a ETA até ao utilizador, e o tratamento da água residual resultante, são operações que requerem bombagem, arejamento, ou outros processos. O uso de eletricidade é um dos principais custos das empresas de abastecimento de água e tende a ser a principal fonte de gases de efeito de estufa durante o abastecimento de água. Num país, onde a redução do gasto energético e emissões é atualmente uma parte importante da agenda nacional, a gestão do uso energético irá ser o principal foco da indústria de água. A maioria da água subterrânea e superficial pode ser tratada por métodos convencionais. Como resultado, o tratamento de água tende a ser um processo de baixo consumo energético quando comparado com a captação e distribuição. Se a fonte for a água do mar ou a água residual, os custos de tratamento aumentam drasticamente devido ao elevado consumo de energia associado, podendo ser o maior contributo para o consumo total de energia utilizada no abastecimento de água (Smith et al., 2019).

Ao contrário de muitas das substâncias orgânicas nos ecossistemas, os metais pesados geralmente não podem ser degradados por vias biológicas (Singh et al., 2019). Por esta razão, os metais pesados acumulam-se na água, alimentos e sedimentos, chegando até ao ser humano através da cadeia alimentar. Os iões destes elementos, que se acumulam nos sistemas biológicos, em determinadas concentrações inibem a atividade biológica ao danificarem as funções celulares. Por esta razão, há a necessidade de reduzir a sua concentração elevada das águas residuais antes que entrem no meio recetor. Muitos dos métodos físico-químicos como a precipitação química, ultrafiltração, oxidação química e redução, purificação eletroquímica, osmose inversa, coagulação/floculação e troca iónica são utilizados para remover estas substâncias da água. Estes métodos, que têm um investimento e custos de operação elevados e necessidades energéticas elevadas, possuem eficiências diferentes para metais diferentes. Quando a concentração do metal na água está no intervalo de 10-100 mg/l, estes métodos podem ser ineficazes ou demasiado dispendiosos (Tatar et al., 2019). Nos últimos anos, as técnicas de fitorremediação utilizam métodos “amigos do ambiente”, que são mais eficientes, têm um investimento e custos de operação menores, necessitam de menos mão-de-obra, e consomem menos energia que os métodos físico-químicos (Tatar et al., 2019).

A remoção de nutrientes do efluente final até ao limite de segurança para reutilização ou descarga, tem sido uma das tarefas mais dispendiosas no tratamento de águas residuais. O efluente final tem sido caracterizado como tendo elevadas concentrações de azoto e fósforo e outros compostos orgânicos e inorgânicos, que quando descarregados numa linha de água podem levar à eutrofização. As estações de tratamento de água residual (ETAR) em muitos países desenvolvidos, têm incorporado um sistema de tratamento terciário que efetua um tratamento biológico e químico avançado com o intuito de remover azoto, fósforo e metais pesados. O processo de tratamento físico-químico funciona por filtração, ozonização, osmose inversa, e absorção por carvão ativado, sendo limitada frequentemente pelos custos

elevados de implementação. Os métodos biológicos são bastante atrativos em termos de tratamento terciário, devido ao custo reduzido de implementação e à criação de produtos de valor acrescentado. As microalgas têm sido conhecidas há décadas por terem o potencial de remover contaminantes das águas residuais. A integração das microalgas no tratamento de águas residuais pode potencialmente oferecer um processo sustentável, de baixo custo e eficiente, que normalmente não contribui com subprodutos (Singh et al., 2019).

Na busca por alternativas de tratamento terciário de águas residuais, as lagoas de macrófitas compostas por *Lemna* spp. demonstraram ser uma opção eficiente e de baixo custo, tendo sido utilizadas com sucesso em sistemas de tratamento de efluentes, principalmente para águas residuais agrícolas e municipais (Alaerts et al., 1996; Körner & Vermaat, 1998; Mohedano et al., 2012a). Estas lagoas possuem uma grande capacidade de remoção de nutrientes, principalmente compostos de azoto e fósforo (Cheng et al., 2002a; Mohedano et al., 2012b).

1.2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a avaliação do crescimento das espécies *Chlorella vulgaris* e *Lemna minor* numa água residual proveniente de uma ETAR. Além das espécies mencionadas foi utilizada uma espécie de crustáceo, *Daphnia magna*, que teve como objetivo analisar a sua interação com as espécies anteriores, de forma a avaliar as interações tróficas por meio de testes multiespécie. A água residual foi diluída de modo a obter diferentes concentrações, com o intuito de avaliar como a concentração de água residual afeta o crescimento das espécies utilizadas em cada ensaio. Utilizou-se a espécie *L. minor* como bioindicador de toxicidade da água residual utilizada nos ensaios experimentais. Com este trabalho, também se pretendeu avaliar a potencial integração da cultura de microalgas e/ou macrófitas no tratamento de efluentes.

1.3 Organização da Dissertação

Esta tese encontra-se organizada em sete capítulos:

Capítulo 1 – Introdução à problemática referente à poluição dos meios aquáticos, soluções de tratamento e objetivos do estudo realizado no âmbito desta dissertação.

Capítulo 2 – Revisão da bibliografia pertinente ao estudo efetuado.

Capítulo 3 - São descritos os materiais e métodos utilizados na realização desta dissertação. Neste capítulo encontra-se a informação relevante ao trabalho laboratorial.

Capítulo 4 – São referidos os resultados obtidos nos ensaios laboratoriais realizados no âmbito desta dissertação.

Capítulo 5 – São apresentadas as conclusões deste trabalho, assim como as perspetivas futuras.

Capítulo 6 – Encontram-se as referências bibliográficas que serviram de base para este estudo.

Capítulo 7 – Constituído pelos anexos, onde se encontram informações adicionais que apoiaram a realização desta dissertação.

2. Revisão bibliográfica

2.1 Diretiva Quadro de Água (2000/60/CE)

O instrumento chave da política Europeia para a gestão da água é a Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu do Conselho de 23 de outubro de 2000, ou de forma abreviada a Diretiva Quadro de Água (DQA) (EC, 2000). Esta Diretiva estabelece o quadro de ação da comunidade europeia de forma a proteger as massas de água interiores, de transição, costeiras e subterrâneas. A DQA descreve “bom estado das águas superficiais” em termos ecológicos e químicos e “bom estado das águas subterrâneas” em termos quantitativos e químicos (Araújo et al., 2015). Em Portugal, a Diretiva n.º 2000/60/CE, foi transposta para o ordenamento jurídico interno pela Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro, alterada pelo Decreto-Lei n.º 245/2009, de 22 de setembro, e pelo Decreto-Lei n.º 77/2006, de 30 de março, alterado pelo Decreto-Lei n.º 103/2010, de 24 de setembro (Decreto-Lei nº 130/2012 de 22 de junho do Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território, 2012).

A DQA foca-se principalmente na qualidade ambiental, substituindo as políticas ambientais fragmentadas que se focam no estatuto químico e físico, adotando uma abordagem holística que considera padrões de qualidade ecológica (Howarth, 2006). A Diretiva visa expandir a proteção a todas as águas, onde se incluem as águas de superfície, subterrâneas, de transição e costeiras.

A DQA introduziu uma mudança crucial na política Europeia de proteção dos recursos aquáticos, desviando o foco no controlo de fontes pontuais de poluição (regulamentos de emissões), para integrar a prevenção e controlo da poluição ao nível da bacia hidrográfica, definindo objetivos de qualidade para as águas recetoras (regulamentos de emissão de efluentes) que são as bases para definir os limites de emissões a jusante do curso de água. Esta nova abordagem faz com que haja mais liberdade para se gerir a bacia devido a expansão das fronteiras do sistema gerido, aumentando o número de sub-sistemas que têm de ser considerados, bem como as interações entre eles - que podem levar por um lado a uma alocação melhor dos recursos económicos para o combate à poluição e introduzir por outro lado um incremento da complexidade na análise, devido às sinergias resultantes da implementação de diferentes medições para componentes distintas do sistema da bacia hidrográfica.

Em particular, de forma a se priorizar as intervenções, a DQA requer explicitamente que seja desenvolvido um plano de gestão da bacia, onde são reveladas as principais pressões e impactos sobre a água que recebe e são decididas as medidas para alcançar os objetivos de qualidade da água. Tais planos podem ser realizados usando principalmente análises qualitativas de especialistas, portanto, sem objetividade (quantificação) e falta de eficiência em termos de tempo e custos, possivelmente falhando na identificação das melhores alternativas e negligenciando as certezas e as incertezas na análise, apenas introduzindo fatores de segurança heurística (Benedetti, 2006).

2.2 Instrumentos legais para controlo da água residual disponíveis em Portugal

Numa perspetiva de proteção da saúde pública, de gestão integrada dos recursos hídricos e de preservação do ambiente, o Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de agosto estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Para se atingirem as metas anteriormente mencionadas, o referido Decreto-Lei define os requisitos a observar na utilização das águas para consumo humano, uso balnear, suporte da vida aquícola e rega. E são ainda definidas as normas de descarga das águas residuais na água e no solo, com o intuito de promover a qualidade do meio aquático e a proteção da saúde pública e dos solos.

A Diretiva 91/271/CEE do Conselho, de 21 de maio de 1991, que diz respeito ao tratamento de águas residuais urbanas, foi criada de forma a proteger o meio ambiente dos efeitos negativos da descarga de águas residuais não devidamente tratadas. Algumas considerações relativas à Diretiva 91/271/CEE (Council Directive 91/271/EEC) são:

- Na generalidade existe a necessidade de um tratamento secundário da água residual urbana, de forma a prevenir eventuais danos ambientais causados por descargas de águas residuais urbanas não tratadas de forma adequada.
- Nas zonas classificadas como sensíveis o tratamento requerido deve ser mais exigente, enquanto em zonas classificadas como menos sensíveis o tratamento primário pode ser considerado suficiente.
- Monitorização das ETAR, águas recetoras e eliminação das lamas, de forma a garantir a proteção do meio ambiente, contra os efeitos negativos das descargas de águas residuais.
- Garantir que a informação relativa à eliminação de águas residuais e lamas esteja disponível ao público, sob a forma de relatórios periódicos.

O Decreto-Lei n.º 152/97 transpõe para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho Europeu, de 21 de maio de 1991, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. A Diretiva n.º 91/271/CEE devido a problemas de interpretação inerentes à sua aplicação, em termos dos requisitos a que devem obedecer as descargas provenientes de ETAR efetuadas em zonas sensíveis sujeitas a eutrofização, levou à publicação da Diretiva n.º 98/15/CE, da Comissão Europeia, de 27 de fevereiro, que determina que se proceda à alteração do Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho. Esta alteração é efetuada pelo Decreto-Lei n.º 348/98 que transpõe para o direito interno a Diretiva 98/15/CE, da Comissão, de 21 de fevereiro. Os Decretos-Lei n.º 261/99, de 7 de julho, n.º 172/2001, de 26 de maio, n.º 198/2008, de 8 de outubro e n.º 133/2005, de 13 de junho introduziram outras alterações no Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, nomeadamente na delimitação de zonas sensíveis e das zonas menos sensíveis e requisitos de descarga (APA, 2020).

De acordo com a legislação Portuguesa, a descarga de águas residuais urbanas só pode ser licenciada quando aquelas águas se submetam a um tratamento secundário, ou seja, tratamento biológico com decantação secundária ou outro processo que permita respeitar os valores exigidos por lei (Decreto-Lei n.º 152/97, 1997).

Relativamente ao meio recetor, caso seja um meio sensível sujeito a eutrofização, é requerido que o efluente tratado tenha concentrações inferiores a 2 mg P/l para o fósforo total e de 15 mg N/l para o azoto total, exigindo-se um mínimo de redução de 80% para o fósforo total e entre 70-80% para o azoto total. Na Tabela 2.1 encontram-se resumidos os requisitos exigidos para descargas no meio recetor por parte das ETAR urbanas. Nesta tabela estão indicados também os valores máximos exigidos para a carência bioquímica de oxigénio ao fim de cinco dias (CBO₅) e da carência química de oxigénio (CQO). A CBO₅ traduz a quantidade de oxigénio dissolvido utilizado pelos microrganismos na oxidação da matéria orgânica presente no meio ao quinto dia e a CQO representa a quantidade de oxigénio necessária para oxidar, por via química, a matéria orgânica.

Tabela 2.1 - Requisitos para as descargas das ETAR urbanas (Decreto-Lei n.º 152/97, 1997).

| Parâmetro | Concentração | Percentagem mínima de redução (%) |
|---|--------------|-----------------------------------|
| CBO ₅ (mg O ₂ /l) | 25 | 70-90 |
| CQO (mg O ₂ /l) | 125 | 75 |
| Fósforo total (mg P/l) | 2 | 80 |
| Azoto total (mg N/l) | 15 | 70-80 |

2.3 Tratamento convencional da água residual doméstica

Numa ETAR, as águas residuais são submetidas a uma série de tratamentos, que envolvem a fase líquida e a fase sólida. Na fase líquida podem existir várias etapas de tratamento: preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento da fase sólida corresponde ao tratamento dos sólidos removidos na fase líquida da água residual (Jane, 2017).

Tratamento preliminar

O tratamento preliminar tem como intuito a remoção de sólidos grosseiros, areias, óleos e gorduras, suscetíveis de afetar as etapas de tratamento a jusante, como por exemplo reduções de eficiências de tratamento e o desgaste de equipamentos. O tratamento preliminar compreende um conjunto de órgãos, tais como grade grossa, tamisador rotativo, o desarenador e o desengordurador (Gray, 2004).

Tratamento primário

Durante o tratamento primário efetua-se a remoção de sólidos sedimentáveis e material sobrenadante utilizando um decantador primário. O decantador primário permite uma redução significativa da carga orgânica na água residual, que irá afluir à etapa seguinte (Metcalf & Eddy, 2003).

Tratamento secundário

O tratamento secundário, que também pode ser designado por tratamento biológico, tem por objetivo remover a matéria orgânica biodegradável (em solução ou suspensão) e sólidos em suspensão, que permanecem no efluente após o tratamento primário. Em muitos casos, neste tipo de tratamento também se faz a remoção de nutrientes, nomeadamente fósforo e azoto (Metcalf & Eddy, 2003). O processo de tratamento envolve um reator, que providencia um ambiente adequado ao desenvolvimento da população microbiana, que irá degradar a matéria orgânica. Existem dois tipos principais de reatores: aqueles onde a biomassa está fixa num meio estruturante, que pode ser de pedra ou plástico, e aqueles onde a biomassa se encontra suspensa em solução. Ao sistema de biomassa suspensa costuma chamar-se lamas ativadas. Posteriormente apenas é necessário a separação dos microrganismos da água por sedimentação (Gray, 2004).

Tratamento terciário

O tratamento terciário terá lugar, se as exigências da qualidade da água residual, não tiverem sido atingidas nas etapas anteriores de tratamento. Este tratamento tem como objetivo, a remoção de determinados poluentes, que se mantêm na água, tais como partículas dificilmente decantáveis e microrganismos patogénicos. A desinfecção, também, é parte do tratamento terciário e pode ser feita, por

exemplo, através de radiação UV ou adição de compostos de cloro. A remoção avançada de nutrientes é por vezes incluída no tratamento terciário (Metcalf & Eddy, 2003).

2.4 Macrófitas e microalgas para o tratamento de águas residuais

A utilização de plantas na remoção de material poluente das águas residuais designa-se por fitorremediação. Em virtude de se utilizarem organismos, a fitorremediação tem um impacto ambiental muito mais reduzido e a sua implementação é esteticamente mais agradável (Pradhan et al., 1998), do que os tratamentos envolvendo tecnologias mais avançadas que, para além do custo mais elevado, também têm necessidades energéticas e uma pegada de carbono maior (Moore, 2010). A fitorremediação tem demonstrado ser, um processo com elevada eficiência de remoção de nutrientes, provenientes de diversos tipos de águas residuais, como domésticas e indústria de lacticínios e destilaria (Mohamed et al., 2017), e tem um elevado potencial para a produção de uma água residual tratada de boa qualidade, quando comparado com o efluente resultante do tratamento primário e secundário (Abou-Shanab et al., 2013). Existem várias espécies que podem ser utilizadas no processo de fitorremediação, contudo a sua seleção depende principalmente da disponibilidade da espécie, da sua taxa fotossintética e tolerância à água residual (Landesman, 2000).

Uma das famílias de plantas aquáticas mais utilizada é a Lemnaceae, em particular várias espécies do género *Lemna*, e.g. a *Lemna gibba* e a *Lemna minor*. Estas espécies têm a vantagem de serem fáceis de cultivar e, em condições favoráveis de temperatura, luminosidade e concentração de nutrientes, possuem um crescimento rápido. A sua estrutura é constituída por uma simples lamela verde de pequenas dimensões lineares, da ordem dos milímetros, designada por fronde, em cuja face inferior se encontra uma raiz filiforme. As frondes flutuam à superfície da água e podem fundir-se em pequenos grupos dando origem a plantas que podem cobrir uma grande superfície de água. A reprodução destas espécies é normalmente vegetativa e obtida por divisão das frondes. As espécies do género *Lemna*, com a sua capacidade para remover do meio aquático, metais pesados e nutrientes, como o fósforo e o azoto, e crescimento rápido, podem ser usadas em aplicações envolvendo, nomeadamente a remoção de nutrientes de águas residuais, testes ecotoxicológicos, alimentação animal e humana e fertilizantes (Appenroth et al., 2013).

As microalgas são também utilizadas no tratamento de águas residuais, nomeadamente as espécies do género *Chlorella*, com destaque para a *Chlorella vulgaris*, em virtude de serem bastante eficientes na remoção de vários compostos de azoto e fósforo, metais pesados, e resíduos tóxicos, eventualmente presentes nessas águas. As microalgas do género *Chlorella* são organismos aquáticos unicelulares de cor verde, com forma esférica e diâmetro da ordem da dezena de micrómetros. As microalgas distribuem-se pela zona eufótica do meio aquático (Upadhyay et al., 2019) e não só à superfície, como é o caso da macrófita do género *Lemna*, não exigindo por isso grandes áreas de exposição, permitindo a implementação de sistemas de tratamento mais compactos. A luz solar e uma pequena quantidade de nutrientes são suficientes para que haja uma multiplicação rápida das espécies de *Chlorella*, dando origem a uma grande concentração de microalgas o que, sob o ponto de vista do tratamento de águas residuais, cria dificuldades técnicas no seu processo de remoção e limita a reutilização da água residual. Contudo, em aplicações envolvendo a produção de biomassa, são desejáveis elevadas concentrações de microalgas.

A utilização simultânea de macrófitas e microalgas no tratamento de água residual cria uma competição entre estes dois tipos de organismos, que pode ser favorável a qualquer um deles, dependendo dos processos dominantes presentes no meio aquático. Com efeito, o aumento da concentração de macrófitas na superfície do meio aquático, provoca uma diminuição da intensidade luminosa que penetra na água, o que conduz a uma redução da atividade microalgal o que poderá, eventualmente, eliminar a população de

microalgas existente. Por sua vez, as microalgas ao reduzirem as concentrações de nutrientes e alterarem as características físicas do meio, podem também afetar o crescimento das macrófitas. Deste modo é necessário ter em consideração todos estes efeitos aquando do processo de desenvolvimento e avaliação de um tratamento de águas residuais envolvendo a utilização conjunta destes dois tipos de organismos aquáticos. O trabalho de Valderrama et al. (2002) mostrou a viabilidade de tratamento de água residual, com níveis elevados de matéria orgânica, através da ação combinada da *C. vulgaris* e *L. minuscula*. Estas espécies foram usadas sequencialmente, primeiro a microalga e depois a macrófita, tendo-se verificado que a microalga foi fundamentalmente eficiente na remoção de nutrientes, enquanto que a macrófita atuou mais na redução da matéria orgânica e precipitação das microalgas.

Fitorremediação de águas residuais com macrófitas

No tratamento de águas residuais, tem-se comprovado a tolerância das espécies de *Lemna* a cargas elevadas de nutrientes orgânicos e inorgânicos e a sua eficiência na remoção de nutrientes tóxicos e metais pesados, assim como na regulação do balanço de oxigénio, sendo muito utilizadas em lagoas de estabilização (Pescod, 1992). Taxas de tratamento efetivas são normalmente sustentadas, pelas elevadas taxas de crescimento destas macrófitas (Lemon et al., 2001; Ziegler et al. 2015) e a sua rápida colonização de áreas amplas, formando coberturas densas (Dussart et al. 1993; Ceschin et al., 2016). Em áreas temperadas e tropicais, algumas espécies de *Lemna* (e.g., *L. minor*, *L. gibba*, *L. minuta*) podem ser utilizadas eficazmente no tratamento de águas residuais durante todo o ano, em virtude de não terem um estado vegetativo latente no período de outono-inverno, embora o ritmo de crescimento diminua quando as temperaturas são baixas.

Têm-se vindo a propor vários tipos de macrófitas flutuantes como agentes de biorremediação de águas residuais, devido às suas características e, também, às suas taxas de crescimento elevadas e fácil manutenção (Salt et al., 1998; Pulford & Watson, 2003; Pilon-Smits, 2005). Entre as macrófitas mais usadas para a biorremediação, encontram-se as plantas da família das Lemnaceae (*Lemna* spp., *Spirodela* spp., *Wolffia* spp. e *Wolffiella* spp.), assim como *Eichhornia crassipes*, *Hydrocotyle umbellata* e o feto aquático *Azolla filiculoides*, sendo de destacar as espécies de plantas da família das Lemnaceae que têm sido utilizadas há mais de 30 anos, na recuperação de nutrientes a partir de águas residuais (Muradov et al., 2014). Em particular, espécies do género *Lemna*, em condições otimizadas de exposição e nutrientes, conseguem duplicar a sua biomassa em menos de dois dias (Leng et al., 1995), devido à sua elevada capacidade de remoção de amoníaco, nitratos e fosfatos do meio aquático (Hasan & Chakrabarti, 2009). Deste modo, as macrófitas permitem mitigar a eutrofização, prevenindo desenvolvimentos exuberantes de algas, que afetam de forma negativa a vida dos organismos aquáticos e garantindo que a qualidade da água seja adequada para o consumo humano (Tyler et al., 2012). Estas macrófitas podem ser uma das soluções, no caso em que o aumento de nutrientes no meio aquático é devido à poluição antropogénica.

No tratamento de águas residuais com macrófitas, é importante investigar os fatores que determinam a sua taxa de crescimento, nomeadamente o pH, temperatura, intensidade luminosa, fotoperíodo e nutrientes (Tabou et al., 2014), de modo a otimizar o seu desempenho. Além disso, a existência de determinados compostos químicos em concentrações elevadas nas águas residuais, e.g., o amoníaco, pode inibir as taxas de absorção do azoto e fósforo e, conseqüentemente, a taxa de crescimento da *L. minor* (Al-Nozaily et al., 2000). No entanto, quando a densidade de plantas no meio é elevada, verifica-se uma diminuição da sua taxa de crescimento, o que pode ser explicada pelo sombreamento devido a parte das plantas, depleção de nutrientes ou alterações de outros parâmetros necessários, para que se mantenha um crescimento ótimo (Jackson, 1980). O efeito relativo ao sombreamento pode ser minimizado, através de uma operação simples de remoção parcial das macrófitas da superfície da água.

Vários autores investigaram a capacidade de remoção de nutrientes por *Lemna* spp. e verificaram a sua eficácia, na remediação de águas residuais com concentrações elevadas de nutrientes (Cheng et al., 2002b; Raju et al. 2010; Cui & Cheng, 2015). Alguns estudos indicaram que o seu potencial de remediação de nutrientes é aproximadamente de 50% do azoto total, 80-90% de amoníaco e 50-60% do fósforo total (Zayed et al., 1998; Mkandawire et al., 2007). Por sua vez, Öbek e Hasar (2002), mostraram que a *L. minor* possui uma elevada capacidade de remoção do fósforo, ao reportarem uma diminuição da concentração de fosfatos de 15 mg/l até 0,05 mg/l, durante os oito dias de tratamento. Os trabalhos de Žaltauskaitė et al. (2014) também indicam uma elevada capacidade de remoção do fósforo que, para o caso em estudo, atingiu quase 100%. Os nitratos e azoto amoniacal foram removidos com eficiências menores, 58,3% e 50-75,3%, respetivamente.

A maioria das evidências do potencial de tratamento de *Lemna* spp. deriva de estudos de laboratório. Estes estudos possuem limitações como, períodos de tempo curtos, pequenos volumes e interações bióticas e abióticas, com menor complexidade do que aquelas que ocorrem em condições (semi) naturais. Portanto, de forma a avaliar adequadamente o desempenho de um sistema de fitorremediação, os estudos laboratoriais devem ser integrados, com observações de sistemas *in-situ*, onde a complexidade natural está presente (Ceschin et al., 2019).

Fitorremediação de águas residuais com microalgas

As águas residuais contêm nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas como o azoto, fósforo e dióxido de carbono. A concentração destes nutrientes depende fundamentalmente de fatores que envolvem o clima, a dimensão populacional e o desenvolvimento económico (Singh et al., 2019). O processo de fitorremediação por microalgas tem como objetivo principal a remoção de nutrientes, como o azoto e fósforo da água residual, através de um processo de assimilação por parte das células das microalgas. Os nutrientes absorvidos através da membrana celular de células de microalgas são transformados no citoplasma, para serem utilizados no processo anabólico (Atiku et al., 2016). O potencial de diversas espécies de microalgas no processo de fitorremediação de diversas águas residuais, tem sido descrito na literatura (Abou-Shanab et al., 2013; Arbib et al., 2014; Zhao et al., 2016). A melhor opção para se atingir uma eficiência elevada na remoção de nutrientes é através do uso de estirpes locais de microalgas, tendo em conta que estas estão aclimatizadas de acordo com as condições à sua volta e são capazes de sobreviver e competir com as bactérias existentes na água residual. Várias espécies de microalgas (como *Scenedesmus dimorphus*, *Botryococcus braunii*, *Chlorella vulgaris* e *Phormidium* sp.), assim como várias espécies de cianobactérias (por exemplo *Spirulina* spp.) demonstraram ter elevada eficiência no processo de fitorremediação, devido ao seu potencial de tolerarem ambientes com condições extremas (Mohamed et al., 2017).

Alguns estudos têm-se focado no uso de microalgas, na etapa de tratamento terciário, para remoção de contaminantes (azoto e fósforo) e de forma a prevenir a ocorrência de eutrofização. Contudo, foi demonstrado que as microalgas, também, podem remover de forma eficiente azoto e fósforo durante o tratamento secundário (Wang et al., 2010).

Outro benefício do uso das microalgas para a fitorremediação inclui a sua capacidade de desinfeção, pelo aumento do valor de pH da água residual tratada, devido à sua elevada atividade fotossintética (Al-Gheethi et al., 2017). Além disso, o tratamento de águas residuais baseado em microalgas, pode reduzir os consumos energéticos associados ao fornecimento de oxigénio, que ocorre num sistema convencional de lamas ativadas, e a emissão de CO₂, devido ao metabolismo autotrófico (Riaño et al., 2011).

O uso de microalgas em fitorremediação e na produção de produtos de valor acrescentado tem sido alvo de investigação. O crescimento das microalgas nas águas residuais pode fornecer uma fonte de biomassa para biocombustível e outras aplicações, como a produção de biomassa para alimentação animal.

Um estudo efetuado por Chabukdhara et al. (2017) demonstrou a viabilidade de utilização de várias espécies de microalgas, para a remoção de metais pesados e produção de biomassa algal para biocombustíveis. Esta abordagem permite estimular a sustentabilidade e a estratégia económica do biocombustível algal.

Algumas espécies de algas possuem uma taxa de crescimento elevada, o que é vantajoso para a fitorremediação (Chekroun & Baghour, 2013). O crescimento algal e a remoção de nutrientes do meio aquático não são só afetados pela disponibilidade de nutrientes, mas também dependem de fatores físicos e bióticos. O papel dos nutrientes é expresso pelo rácio molar ótimo dos nutrientes disponíveis. O rácio empírico entre o azoto e o fósforo é de 16:1 (Tett et al., 1985), contudo é muito variável entre espécies e é afetado pelas condições ambientais (Cuellar-Bermudez et al., 2017). Os fatores físicos envolvem o pH (Azov & Shelef, 1987), a intensidade luminosa e a temperatura (Talbot & De la Noüe, 1993). Um dos fatores bióticos que influencia de forma significativa o crescimento das algas é a sua densidade inicial. Sendo expectável que a uma maior densidade algal esteja associado a um maior crescimento e uma maior remoção de nutrientes (Lau et al., 1995), é de realçar que uma densidade algal elevada poderá ter o efeito oposto devido ao sombreamento originado pelas próprias algas, uma acumulação de auto-inibidores e consequente redução da atividade fotossintética (Fogg, 1975; Darley, 1982). Adicionalmente, a presença de organismos herbívoros, como o zooplâncton ou rotíferos, podem impedir o normal crescimento das microalgas e limitar a remoção dos nutrientes (Lavrinovičs & Juhna, 2017).

A água residual doméstica contém frequentemente concentrações elevadas de azoto e fósforo que podem ser eficientemente removidos usando microalgas (Goldberg & Cohen, 2006; Chiu et al., 2015). Lau et al. (1996), estudaram a capacidade de remoção de nutrientes por *C. vulgaris* e reportaram uma eficiência de remoção de 86% para o azoto inorgânico e 78% para o fósforo inorgânico. Noutros estudos, observou-se que a taxa de remoção do azoto total por *C. vulgaris*, cultivada numa água residual doméstica, foi entre 61,1%-91,8% (Min et al., 2011; Cho et al., 2011; Dahmani et al., 2016). Taxas de remoção de 100% para o azoto e fósforo total foram reportadas para uma água residual doméstica, proveniente do tratamento terciário, onde foi utilizada *C. vulgaris* (Ji et al., 2013). Este estudo refere que foram necessários quatro dias para remover totalmente as concentrações iniciais de 8,7 e 1,17 mg/l de azoto e fósforo total respetivamente. Mais recentemente, no trabalho de Singh et al. (2017), foram estudadas, durante 10 dias, as eficiências de remoção de azoto e fósforo total para concentrações de água residual de 10%, 20% e 30%. Para estas concentrações aqueles autores obtiveram eficiências de remoção de azoto total e fósforo total de 81,1%, 80,6%, 88% e 93,5%, 97,8%, 98,4% respetivamente.

Competição entre macrófitas e microalgas

Vários autores têm vindo a analisar a capacidade que as espécies do género *Lemna* têm para remover quantidades consideráveis de nutrientes de uma água residual (Alaerts et al., 1996; Körner & Vermaat, 1998). Contudo, quando as espécies do género *Lemna* não cobrem toda a superfície da água, pode haver o desenvolvimento de microalgas, que irão limitar o crescimento de *Lemna* spp. (Edwards et al., 1992). No estudo de Szabo et al. (2005) foram analisados os fatores chave, que são responsáveis pela redução do crescimento de *Lemna* sp., quando sob competição com várias espécies de microalgas. Os resultados indicam, que as microalgas inibem o crescimento de *Lemna* sp., através da remoção de N, P, Fe e Mn do meio de cultura e ao aumento dos valores de pH devido à atividade fotossintética intensa. Dos vários fatores analisados, que inibiram significativamente o crescimento de *Lemna* sp., o primeiro envolve a redução de N, o segundo o aumento dos valores de pH, seguindo-se a redução de P, Fe e Mn. Os fatores

limitantes, particularmente o N e pH elevado, determinam um crescimento quase nulo de *Lemna* sp., no final do tempo de incubação. Diversos estudos relatam que o crescimento das espécies da família Lemnaceae é inibido por soluções com uma alcalinidade elevada (McLay, 1976). Contudo, quando as microalgas e as espécies do género *Lemna* crescem em conjunto, estas poderão proliferar até um ponto em que supera o efeito inibidor da presença acentuada de microalgas, se o nível de nutrientes for suficientemente elevado para garantir uma taxa de crescimento significativa (Roijackers et al., 2004).

Dinâmica entre microalgas e microcrustáceos do género *Daphnia*

A *Daphnia magna* (família Daphniidae) são organismos planctónicos, que têm uma elevada importância na cadeia alimentar aquática (Almeida, 2018). Como consumidores primários das microalgas, a *Daphnia* desempenha um papel de organismo herbívoro nos sistemas de cultivo de microalgas em lagos e lagoas (Flynn et al., 2017), absorvendo nutrientes a partir das células das microalgas (Lass & Spaak 2003; Long et al., 2007; Kring et al., 2013). Em meios aquáticos de água doce, *D. magna* pode partilhar o meio com diferentes espécies de microalgas, que diferem em termos das suas dimensões, morfologia, e conteúdo nutritivo. Contudo, *D. magna* tem preferência por células de microalgas com dimensões na gama de 5-50 µm (Bern, 1994; Dodson & Frey, 2001), que é o caso das espécies dos géneros *Chlorella* e *Scenedesmus*. Estas espécies são por isso, frequentemente, utilizadas no estudo do crescimento de *D. magna* (Alva-Martínez et al., 2001). Este microcrustáceo é responsável, por um declínio rápido de uma elevada quantidade de microalgas nos sistemas naturais (Betini et al., 2017), podendo levar a um decréscimo da densidade de microalgas da ordem dos 99%, em apenas alguns dias (Park et al., 2011). Vadlamani et al. (2017) investigaram o efeito do pH do meio, na atividade de *D. magna* com *Chlorella sorokiniana*, tendo observado a morte da população de *D. magna* para um valor de pH de 10, mas ainda ativa para um valor de pH de 8,2.

Dinâmica entre *macrófitas* e microcrustáceos do género *Daphnia*

As *macrófitas* são produtores primários e os microcrustáceos do género *Daphnia* são consumidores primários, e a sua utilização permite uma representação de diferentes níveis tróficos. A espécie *D. magna* embora seja herbívora, não se alimenta da *L. minor*, tem preferência por microalgas. A *L. minor*, ao alterar o pH do meio, irá afetar a atividade da *D. magna* (Vadlamani et al., 2017).

2.5 Testes de toxicidade

A eficácia do tratamento das águas residuais deve ser monitorizada para que se possa garantir a qualidade exigida ao efluente no meio recetor. A Diretiva Quadro de Água (2000/60/EC) faz o enquadramento e estabelece os parâmetros que garantem um bom estado químico e biológico das águas no meio recetor.

A água residual é caracterizada pelas suas propriedades físicas, químicas e biológicas sendo por isso avaliada através de parâmetros associados a estas propriedades. Tradicionalmente, o controlo da qualidade dos efluentes emitidos no meio recetor era baseado em análises físico-químicas com vista à determinação de, e.g., carência química e biológica de oxigénio, pH, sólidos dissolvidos ou não, metais pesados e compostos orgânicos (Guemmaz et al. 2019). Contudo a análise físico-química da água só muito dificilmente pode detetar compostos químicos com concentrações muito baixas, devido aos limites de deteção impostos experimentalmente (Bundschuh, 2014). Além disso, a quantificação de alguns compostos individuais não permite tirar conclusões dos efeitos isolados ou combinados desses compostos, presentes na água residual, sobre o ecossistema. De modo a ultrapassar as limitações atrás referidas uma nova metodologia para os testes, foi entretanto adotada e designada por ecotoxicologia que, neste contexto, se baseia nos efeitos das águas residuais sob análise, em organismos vivos aquáticos. Os testes

ecotoxicológicos como os bioensaios permitem avaliar os efeitos dos componentes físicos, químicos, biológicos, e as várias interações entre eles, sobre os organismos aquáticos (Maltby et al., 2000). Os bioensaios podem usar uma única espécie ou diferentes espécies de organismos representativas dos diversos níveis tróficos da cadeia alimentar e permitem uma avaliação correta da qualidade da água (Farré & Barceló, 2003; Silva et. al., 2009). A seleção de organismos teste, que representem os diversos níveis tróficos é, contudo, crucial para uma correta avaliação dos parâmetros em estudo (Manusadzianas et al., 2003). Atualmente um grande número de países europeus utiliza os testes ecotoxicológicos em conjunto com os testes físico-químicos para fazerem uma caracterização completa das águas residuais (Power et al., 2004).

Os testes ecotoxicológicos são escolhidos em função dos requisitos definidos previamente, para a qualidade dos efluentes e têm de ter em consideração as características do efluente e do organismo ou organismos utilizados. Os testes ecotoxicológicos efetuados no laboratório podem ser classificados em termos do tempo de exposição do organismo-teste à solução-teste ou em termos do sistema solução-teste usado (Costa et.al., 2008). No primeiro caso, os testes são classificados como agudos ou crónicos e no segundo caso, como estáticos ou semi-estáticos.

Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda têm como principal objetivo, determinar a concentração da solução-teste ou do efluente, que irá produzir um efeito adverso, num grupo de organismos-teste de uma dada espécie, durante uma exposição a curto prazo, comparado com o ciclo de vida da espécie. O efeito, normalmente, investigado é o da morte da população de organismos, embora também se possam considerar outras situações, como a sua imobilização ou inibição de crescimento. O período de exposição depende do ciclo de vida da espécie utilizada, mas em geral, varia entre um e quatro dias. O nível de toxicidade aguda é medido em termos dos parâmetros designados por concentração letal (CL) ou concentração efetiva (CE), que indicam a concentração de amostra que provoca a morte, ou a imobilização ou inibição do crescimento, de uma dada percentagem da população de organismos utilizada, respetivamente. Em geral, a percentagem considerada é de 50% e, neste caso, os parâmetros referidos escrevem-se como CL₅₀ e CE₅₀. Os valores de CL₅₀ e CE₅₀ normalizados pelo peso do organismo têm carácter mais geral e designam-se por dose letal e dose efetiva, DL₅₀ e DE₅₀, respetivamente (NC DEQ).

Testes de toxicidade crónica

Os testes de toxicidade crónica permitem avaliar os efeitos adversos da solução-teste ou de um efluente num período de tempo longo, que pode abranger uma grande parte ou a totalidade do ciclo de vida da espécie utilizada. Os produtos tóxicos sob análise não vão só afetar a sobrevivência dos organismos, mas em concentrações subletais podem alterar as suas funções fisiológicas e biológicas, como por exemplo, o crescimento e a reprodução. Os resultados dos testes de toxicidade aguda, através dos parâmetros CL₅₀ e CE₅₀, permitem identificar as concentrações da solução-teste, que podem ser usadas nos testes de toxicidade crónica. Estes testes são especialmente importantes nas amostras de águas residuais, na sua fase final de tratamento, em virtude de possuírem, normalmente, uma concentração muito baixa de produtos tóxicos, não detetáveis pelos testes de toxicidade aguda. Os parâmetros associados aos testes de toxicidade crónica são a concentração do efeito não observado (CENO) e a concentração do efeito observado (CEO) (Metcalf & Eddy, 2003). O parâmetro CENO representa a maior concentração da solução-teste que, não tem efeito nocivo sobre o organismo, enquanto que a CEO representa, a menor concentração da solução-teste que tem efeito nocivo sobre o organismo. Recentemente os parâmetros CENO e CEO têm vindo a ser substituídos pelo CL₁₀₋₂₀ e CE₁₀₋₂₀ (Costa et.al.,2008).

Testes estáticos

Os testes estáticos são caracterizados pela utilização da mesma solução-teste, durante todo o período do ensaio, e são mais adequados quando as concentrações dos produtos tóxicos sob análise no final do ensaio não são muito diferentes das que existem no seu início. Embora sejam testes simples, baratos e versáteis, são menos sensíveis e rigorosos do que os métodos semi-estáticos.

Testes semi-estáticos

No caso dos testes semi-estáticos, a solução-teste inicial é renovada periodicamente, parcial ou totalmente, com soluções-teste com a mesma concentração. Neste tipo de testes alguns dos problemas relevantes para os testes estáticos podem ser ultrapassados (e.g., contaminação da solução-teste pelos organismos-teste, aumento de CBO e CQO), contudo exigem um volume maior da solução-teste.

Na categoria do sistema de solução-teste existem, ainda, os chamados testes dinâmicos que, devido à sua complexidade e dificuldade de implementação, não podem ser efetuados no laboratório.

Testes dinâmicos

Os testes dinâmicos ou de fluxo contínuo caracterizam-se por uma alteração contínua da solução teste durante o período de teste. Estes testes são recomendados quando é esperado, que as concentrações sofram um declínio de mais do que 20%, durante um teste estático ou semi-estático. Os testes dinâmicos apresentam diversas vantagens, como a manutenção do oxigénio dissolvido nas câmaras teste, e redução da probabilidade de o agente tóxico desaparecer devido a volatilização, adsorção, entre outros, permitindo por isso, fazer uma avaliação mais representativa da toxicidade da solução teste. Contudo, estes tipos de testes requerem elevados volumes de amostra e água para diluição, são mais complexos e requerem mais espaço e equipamento com custos elevados (OECD, 2018; USEPA, 2002).

Testes multiespécies

Testes de toxicidade, com uma única espécie indicam a sensibilidade relativa dos organismos, mas não as interações entre organismos em termos das dinâmicas de competição e herbivorismo (Swartzman et al., 1990). Assim, tem-se vindo a discutir, se a informação desses testes por si só, será adequada à previsão dos efeitos ao nível do ecossistema (Cairns et al., 1996). A utilização de modelos de ecossistemas ou parte deles, em que os organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos são expostos de forma simultânea, a um determinado composto químico, já permite uma interpretação mais realista dos efeitos tóxicos desse composto, incluindo os resultantes das relações interespecíficas (Maia et al., 2001, Boxall et al., 2002). Os modelos do ecossistema diferem em tamanho e complexidade, designados por microcosmos ou mesocosmos, e têm a vantagem de aproximar os ensaios laboratoriais aos ensaios de campo, serem replicáveis e poderem ser controlados facilmente (Daam & Van den Brink, 2011). Infelizmente, a quantidade de tempo e recursos necessários para realizar tais ensaios, faz com que não sejam utilizados, como ensaios de rotina (Newman & Unger, 2003). Deste modo, a avaliação dos efeitos dos compostos químicos no ecossistema baseia-se, frequentemente, em testes de toxicidade com uma única espécie, apesar das suas limitações (Sanderson et al., 2004; Schindler, 1998).

2.6 Organismos utilizados em testes de toxicidade

A toxicidade aquática refere-se, geralmente, aos efeitos de um dado composto químico num organismo que se encontra no ambiente aquático, e é determinada por intermédio de organismos representativos dos três níveis tróficos (EU Science HUB):

- Algas e plantas, representam os “produtores primários”.
- Invertebrados (e.g. crustáceos como *Daphnia* spp.), representam os “consumidores primários”.
- Vertebrados (geralmente peixes), representam os “consumidores secundários”.

Assim, diferentes organismos como peixes, algas, bactérias, entre outros, podem ser utilizados em testes ecotoxicológicos, os quais, de acordo com alguns autores, são a melhor forma de avaliar a toxicidade de um efluente (Ford, 1998; Metcalf & Eddy, 2003).

Bactérias

As bactérias mais, frequentemente, utilizadas nos testes de toxicidade são as espécies *Vibrio fischeri* e *Vibrio harveyi*, que possuem bioluminescência. Quando as bactérias são afetadas por substâncias tóxicas há uma disrupção no seu metabolismo, que afeta a sua capacidade de bioluminescência. A perda de bioluminescência é proporcional à quantidade de compostos prejudiciais, que afetam a bactéria (Szczercińska & Galczyńska, 2015). Outra espécie utilizada nos testes ecotoxicológicos é *Salmonella typhimurium*, que permite detetar substâncias mutagénicas, entre outras (DeLuca et al., 1983). Por sua vez, a espécie *Escherichia coli* é utilizada em testes que têm o objetivo de detetar compostos que podem afetar o ADN, levando à sua destruição (Quillardet et al., 1982).

Microalgas

Algumas espécies de microalgas são, frequentemente, usadas como organismos indicadores de toxicidade. Usa-se frequentemente em ensaios de toxicidade, as microalgas dos géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Selenastrum* (Cid et al., 2012). As vantagens do uso das microalgas como organismo-teste devem-se ao seu curto ciclo de vida e elevadas taxas de crescimento. Utilizam-se testes, como o teste de inibição do crescimento da OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico) 201 (OECD, 2011), onde é preferível usar espécies, que tenham uma taxa de crescimento elevada. No conjunto dos métodos normalizados, para avaliar a toxicidade com microalgas, expõe-se o organismo-teste a diferentes concentrações de água residual, ou composto químico durante um determinado período de tempo. No final do período de tempo preconizado para o ensaio, de acordo com o crescimento da microalga, pode-se inferir se a concentração do composto tóxico inibiu ou não o crescimento (EPA, 2002).

Plantas

Espécies representantes dos produtores primários como *L. minor*, *L. gibba* e *L. perpusilla* são, frequentemente, utilizadas como organismos teste, indicadores de toxicidade (EPA, 2002). Estas espécies são sensíveis aos efeitos de compostos tóxicos e metais pesados existentes no meio aquático. Utilizam-se testes de acordo com a norma ISO (ISO/DIS 20079, 2004), para se analisar, qual a influência que determinados compostos tóxicos têm no crescimento da planta após sete dias. Os compostos tóxicos

podem levar a alterações ao nível do número de raízes e à sua morfologia, número de frondes, dimensão das frondes e coloração destas, e número de plantas (Bielinska & Nalecz-Jawecki, 2009).

Invertebrados

Nos testes de toxicidade com invertebrados, os organismos mais utilizados são as espécies dos géneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia*, que pertencem à ordem Cladocera. As muitas vantagens do seu uso, devem-se à elevada sensibilidade aos compostos tóxicos e ciclo reprodutivo curto. Nos testes de toxicidade com estes organismos, os parâmetros medidos são a mortalidade ou a reprodução (Farré & Barcelo, 2003). Além dos organismos-teste mencionados anteriormente, também são utilizadas as espécies do género *Anodonta* (mexilhões de água doce) e a *Artemia salina* (crustáceo de água salgada) (Szczerbińska & Galczyńska, 2015).

Vertebrados

Os peixes são utilizados como bioindicadores da contaminação do meio aquático porque, ao estarem posicionados no final da cadeia trófica de um ecossistema, podem refletir o nível de qualidade da água (Rahman et al., 2014).

Os testes de toxicidade com peixes são usualmente baseados na taxa de crescimento e sobrevivência dos peixes, em que estes são expostos a uma gama de efluentes, durante um período de um a dois dias ou até sete dias. O teste de toxicidade aguda com peixes, quantifica a concentração de um químico que leva à mortalidade de 50% dos indivíduos, expostos a esse composto tóxico, após 96 horas. Espécies como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), e o vairão (*Pimephales promelas*) são usadas como organismos-teste em ensaios de toxicidade (Tothill & Turner, 1996).

3. Materiais e métodos

3.1 Processo de seleção da ETAR mais adequada ao sistema de fitorremediação

Neste estudo foi desenvolvido um sistema de classificação, com vista a determinar qual a ETAR que possui um efluente com as características mais apropriadas para a realização dos ensaios laboratoriais. Por uma questão de logística, foram selecionadas todas as ETAR geridas pela SIMARSUL, localizadas na península de Setúbal.

Foram definidos oito parâmetros: população equivalente, distância FCT/ETAR, microtamização, condutividade média do efluente final, informação disponível sobre a ETAR, concentração média da CQO no efluente final, rácio N:P e implementação do sistema de produção de biomassa. Os parâmetros foram pontuados num intervalo de 0 a 100 e, dependendo da sua importância, foi-lhes atribuído um peso entre 0 e 1, garantindo, contudo, que o somatório dos pesos relativos aos oito parâmetros é igual a 1.

No sentido de se determinar qual a melhor opção, as ETAR foram classificadas utilizando o método de Combinação Linear Ponderada (WLC) (Kanwal et al., 2020), expresso através da expressão 3.1.

$$\text{Classificação ETAR} = \sum_{i=1}^n w_i q_i \quad [3.1]$$

q_i – valor do parâmetro i numa escala de 0-100

w_i – peso atribuído ao parâmetro

n – número de parâmetros utilizados

A informação que serviu de base a esta classificação foi disponibilizada pela SIMARSUL, que é a empresa responsável pela gestão e exploração do sistema multimunicipal de saneamento de águas residuais da península de Setúbal. Os parâmetros a avaliar foram obtidos para um total de 20 ETAR, à exceção da ETAR de Canha, por se encontrar em período de teste na altura em que se iniciou este estudo. Os parâmetros encontram-se referidos na Tabela 3.1, assim como o peso atribuído a cada um deles. O valor dos pesos associados a cada parâmetro tem em linha de conta a importância deste parâmetro na classificação da ETAR. Os parâmetros mais importantes possuem uma ponderação mais elevada.

Tabela 3.1 - Peso atribuído a cada um dos parâmetros.

| Nº | Parâmetro | Peso |
|----|--|------|
| 1 | População equivalente (habitantes) | 0,05 |
| 2 | Distância FCT/ETAR (km) | 0,05 |
| 3 | Microtamização | 0,1 |
| 4 | Condutividade média do efluente final | 0,15 |
| 5 | Informação disponível sobre a ETAR | 0,05 |
| 6 | Concentração média da CQO no efluente final | 0,25 |
| 7 | Rácio N:P | 0,25 |
| 8 | Implementação do sistema de produção de biomassa | 0,1 |
| | Total | 1 |

População equivalente (habitantes)

Este parâmetro refere-se à população para a qual a ETAR foi dimensionada em horizonte de projeto e, permite inferir a quantidade de água residual produzida e a pressão sobre os meios aquáticos, aquando da sua descarga no meio aquático recetor. A escala de pontuação de acordo com o número de habitantes encontra-se referida na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Escala de pontuação para a população equivalente (habitantes).

| População equivalente (habitantes) | Pontuação |
|------------------------------------|-----------|
| 295000 | 100 |
| 100000-295000 | 80 |
| 50000-100000 | 60 |
| 10000-50000 | 40 |
| 1500-10000 | 20 |
| 0-1500 | 0 |

Distância FCT/ETAR

O parâmetro distância entre a FCT e a ETAR, foi um parâmetro tido em linha de conta devido à logística inerente a este estudo. As distâncias foram obtidas recorrendo ao “google maps” e coordenadas GPS de cada ETAR e da FCT. A escala de pontuação estabelecida está indicada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Escala de pontuação para a distância FCT/ETAR.

| Distância FCT/ETAR (km) | Pontuação |
|-------------------------|-----------|
| 0-20 | 100 |
| 20-40 | 80 |
| 40-60 | 60 |
| 60-80 | 40 |
| 80-100 | 20 |
| 100-120 | 0 |

Microtamização

A microtamização permite um tratamento secundário mais eficiente, o que faz com que o efluente tratado tenha uma qualidade superior, com vista à sua utilização pelas espécies em estudo, potenciando a viabilidade desse efluente como meio de cultura. A escala de pontuação para a microtamização encontra-se na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Escala de pontuação para a microtamização.

| Microtamização | Pontuação |
|----------------|-----------|
| Existe | 100 |
| não existe | 0 |

Condutividade média do efluente final

O valor da condutividade do efluente final permite inferir a existência ou não de intrusão salina, tendo em consideração que as espécies utilizadas neste estudo são afetadas negativamente pela presença de cloreto de sódio, em determinadas concentrações. A escala de pontuação para a condutividade média do efluente final pode ser consultada na Tabela 3.5, e tem em linha de conta o aumento da condutividade com o aumento da concentração de cloreto de sódio.

Tabela 3.5 - Escala de pontuação para a condutividade média do efluente final.

| Condutividade média efluente final ($\mu\text{S}/\text{cm}$) | Pontuação |
|--|-----------|
| <1400 | 100 |
| 1400-2100 | 90 |
| 2100-2800 | 80 |
| 2800-3500 | 70 |
| 3500-4200 | 60 |
| 4200-4900 | 50 |
| 4900-5600 | 40 |
| 5600-6300 | 30 |
| 6300-7000 | 20 |
| 7000-7700 | 10 |
| >7700 | 0 |

Informação disponível sobre a ETAR

Sem informação, os resultados obtidos não passariam de conjeturas que poderiam representar uma realidade muito diferente da que atualmente existe nas várias ETAR. A informação foi baseada em documentos disponíveis na internet e informação providenciada pela SIMARSUL. A escala de pontuação para este parâmetro encontra-se referida na Tabela 3.6.

Tabela 3.6 - Escala de pontuação para a informação disponível sobre a ETAR.

| Informação disponível | Pontuação |
|--|-----------|
| Trabalhos com informação detalhada sobre a ETAR | 100 |
| Linha de tratamento, informação relativa a remoção de nutrientes | 75 |
| Linha de tratamento | 50 |

Concentração média de CQO no efluente final

Como se pretende avaliar a viabilidade do efluente no processo de biorremediação, considerou-se pertinente que o valor da concentração média de CQO no efluente final fosse superior ao exigido pelo Decreto-Lei n.º 236/98, pois caso contrário, não seria necessário a implementação do sistema, já que os valores exigidos estariam a ser cumpridos. A escala de pontuação para este parâmetro encontra-se referida na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 - Escala de pontuação para a concentração média de CQO no efluente final.

| CQO no efluente final (mgO ₂ /l) | Pontuação |
|---|-----------|
| <30 | 0 |
| 30-50 | 25 |
| 60-125 | 50 |
| 125- 190 | 100 |
| 190-255 | 50 |
| >255 | 0 |

Rácio N:P

O rácio N:P indica se existe limitação de nutrientes no efluente da ETAR, sendo desejável que o efluente escolhido tenha um rácio adequado ao crescimento das duas espécies utilizadas. Utilizou-se a razão de Redfield, em termos do rácio da massa de N e P, sendo que o valor ótimo para o rácio N/P em termos de produtividade de biomassa e remoção de nutrientes numa água residual doméstica varia entre 5 e 30, dependendo da composição da água residual (Choi & Lee, 2014). A escala de de pontuação para este parâmetro encontra-se na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 - Escala de pontuação para o rácio N:P.

| N:P | Pontuação |
|-------|-----------|
| 0-1 | 0 |
| 1-3 | 25 |
| 3-5 | 50 |
| 5-9 | 100 |
| 9-13 | 50 |
| 13-20 | 25 |
| >20 | 0 |

Implementação do sistema de produção de biomassa

Pensando num cenário futuro, a etapa posterior a este estudo será a produção de biomassa num sistema piloto e, caso o sistema funcione, implementá-lo numa ETAR. Este parâmetro permite avaliar a viabilidade de implementação do sistema de produção de biomassa. A escala de pontuação para este parâmetro encontra-se na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Escala de pontuação para a implementação do sistema de produção de biomassa.

| Implementação do sistema de produção de biomassa | Pontuação |
|--|-----------|
| Existência de infraestruturas | 100 |
| Área suficiente disponível para construção | 75 |
| Área limitada | 50 |
| Impossibilidade de construção | 0 |

Na Tabela 3.10 apresenta-se a pontuação dos vários parâmetros para cada ETAR, de acordo com as escalas de pontuação definidas anteriormente nas Tabelas 3.2 a 3.9.

Tabela 3.10 - Pontuação de cada parâmetro por ETAR

| ETAR | População equivalente | Distância FCT/ETAR | Microtamização | Condutividade média do efluente final | Informação disponível sobre a ETAR | Concentração média de CQO no efluente final | Rácio N:P | Implementação do sistema de produção de biomassa |
|---------------------|-----------------------|--------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|-----------|--|
| Afonsoeiro | 40 | 0 | 0 | 90 | 75 | 50 | 25 | 100 |
| Águas de Moura | 20 | 60 | 0 | 100 | 75 | 0 | 100 | 75 |
| Aires | 20 | 80 | 0 | 100 | 75 | 50 | 0 | 75 |
| Alcochete | 40 | 40 | 0 | 90 | 75 | 50 | 50 | 75 |
| Barreiro-Moita | 100 | 80 | 0 | 80 | 100 | 50 | 50 | 75 |
| Cucena | 40 | 80 | 0 | 0 | 75 | 25 | 50 | 75 |
| Fernão Ferro | 40 | 100 | 100 | 100 | 100 | 25 | 100 | 50 |
| Lagoa/Meco | 40 | 80 | 0 | 100 | 75 | 25 | 100 | 75 |
| Lagoinha | 40 | 80 | 100 | 100 | 75 | 50 | 50 | 50 |
| Montado | 20 | 60 | 100 | 100 | 75 | 50 | 100 | 75 |
| Pegões | 20 | 40 | 0 | 100 | 75 | 0 | 50 | 75 |
| Pinhal Novo | 40 | 60 | 100 | 100 | 75 | 100 | 50 | 75 |
| Poceirão | 20 | 40 | 0 | 100 | 75 | 25 | 50 | 75 |
| Quinta do Conde | 60 | 80 | 100 | 100 | 75 | 100 | 50 | 75 |
| Santo Isidro Pegões | 0 | 40 | 0 | 90 | 75 | 50 | 50 | 75 |
| Seixal | 80 | 0 | 0 | 40 | 100 | 50 | 25 | 75 |
| Seixalinho | 40 | 40 | 0 | 40 | 75 | 25 | 25 | 100 |
| Sesimbra | 40 | 80 | 0 | 80 | 75 | 50 | 50 | 0 |
| Taipadas | 0 | 40 | 0 | 100 | 75 | 25 | 0 | 75 |
| ZI Autoeuropa | 40 | 80 | 100 | 90 | 100 | 50 | 50 | 75 |

A classificação de cada ETAR encontra-se referida na Tabela 3.11, onde o valor numérico de cada um dos parâmetros corresponde à sua pontuação multiplicada pelo respetivo peso. Desta tabela retiraram-se as três ETAR mais bem classificadas, cujos resultados se apresentam na Tabela 3.12. Concluiu-se que a ETAR com a classificação mais elevada foi a da Quinta do Conde, com o valor de 80,75, tendo sido por isso a selecionada.

Tabela 3.11 - Classificação das ETAR.

| ETAR | População equivalente | Distância ETAR/ FCT | Microtamização | Condutividade média do efluente final | Informação disponível sobre a ETAR | Concentração média de CQO no efluente final | Rácio N:P | Implementação do sistema de produção de biomassa | Total |
|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|-----------|--|--------------|
| Afonsoeiro | 2 | 0 | 0 | 13,5 | 3,75 | 6,25 | 12,5 | 10 | 48 |
| Águas de Moura | 1 | 3 | 0 | 15 | 3,75 | 25 | 0 | 7,5 | 55,25 |
| Aires | 1 | 4 | 0 | 15 | 3,75 | 0 | 12,5 | 7,5 | 43,75 |
| Alcochete | 2 | 2 | 0 | 13,5 | 3,75 | 12,5 | 12,5 | 7,5 | 53,75 |
| Barreiro-Moita | 5 | 4 | 0 | 12 | 5 | 12,5 | 12,5 | 7,5 | 58,5 |
| Canha | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cucena | 2 | 4 | 0 | 0 | 3,75 | 12,5 | 6,25 | 7,5 | 36 |
| Fernão Ferro | 2 | 5 | 10 | 15 | 5 | 25 | 6,25 | 5 | 73,25 |
| Lagoa/Meco | 2 | 4 | 0 | 15 | 3,75 | 25 | 6,25 | 7,5 | 63,5 |
| Lagoinha | 2 | 4 | 10 | 15 | 3,75 | 12,5 | 12,5 | 5 | 64,75 |
| Montado | 1 | 3 | 10 | 15 | 3,75 | 25 | 12,5 | 7,5 | 77,75 |
| Pegões | 1 | 2 | 0 | 15 | 3,75 | 12,5 | 0 | 7,5 | 41,75 |
| Pinhal Novo | 2 | 3 | 10 | 15 | 3,75 | 12,5 | 25 | 7,5 | 78,75 |
| Poceirão | 1 | 2 | 0 | 15 | 3,75 | 12,5 | 6,25 | 7,5 | 48 |
| Quinta do Conde | 3 | 4 | 10 | 15 | 3,75 | 12,5 | 25 | 7,5 | 80,75 |
| Santo Isidro Pegões | 0 | 2 | 0 | 13,5 | 3,75 | 12,5 | 12,5 | 7,5 | 51,75 |
| Seixal | 4 | 0 | 0 | 6 | 5 | 6,25 | 12,5 | 7,5 | 41,25 |
| Seixalinho | 2 | 2 | 0 | 6 | 3,75 | 6,25 | 6,25 | 10 | 36,25 |
| Sesimbra | 2 | 4 | 0 | 12 | 3,75 | 12,5 | 12,5 | 0 | 46,75 |
| Taipadas | 0 | 2 | 0 | 15 | 3,75 | 0 | 6,25 | 7,5 | 34,5 |
| ZI Autoeuropa | 2 | 4 | 10 | 13,5 | 5 | 12,5 | 12,5 | 7,5 | 67 |

Tabela 3.12 - Resultados para as três ETAR mais bem classificadas.

| ETAR | População equivalente | Distância ETAR/FCT | Microtamização | Condutividade média do efluente final | Informação disponível | Concentração média de CQO no efluente final | Rácio N:P | Implementação do sistema de produção de biomassa | Total |
|-----------------|-----------------------|--------------------|----------------|---------------------------------------|-----------------------|---|-----------|--|--------------|
| Quinta do Conde | 3 | 4 | 10 | 15 | 3,75 | 12,5 | 25 | 7,5 | 80,75 |
| Pinhal Novo | 2 | 3 | 10 | 15 | 3,75 | 12,5 | 25 | 7,5 | 78,75 |
| Montado | 1 | 3 | 10 | 15 | 3,75 | 25 | 12,5 | 7,5 | 77,75 |

3.2 Caracterização da ETAR da Quinta do Conde

A ETAR da Quinta do Conde (Figura 3.1), situa-se no concelho de Sesimbra e está inserida no Subsistema da Quinta do Conde que inclui, além desta infraestrutura, cerca de 46 Km de emissários e condutas elevatórias e 11 estações elevatórias (SIMARSUL).



Figura 3.1 - ETAR da Quinta do Conde (SIMARSUL).

Na Figura 3.2 apresenta-se a implantação esquemática da ETAR da Quinta do Conde, com a identificação e localização dos diferentes órgãos.

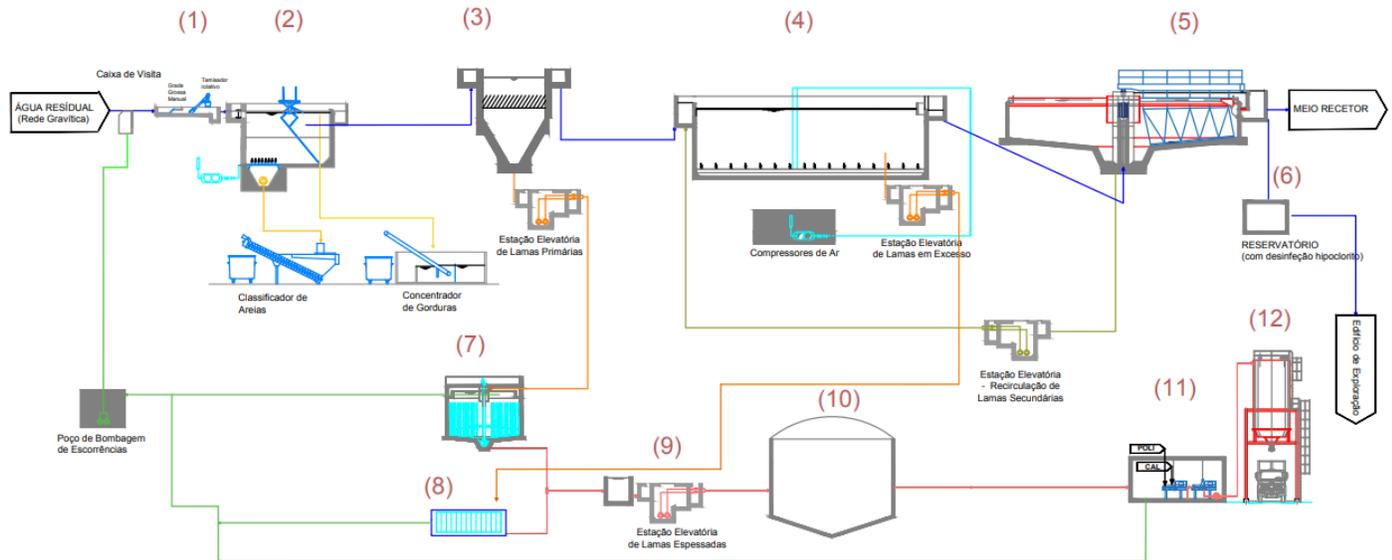


Figura 3.2 - Implantação esquemática da ETAR da Quinta do Conde.

A ETAR da Quinta do Conde tem capacidade para efetuar o tratamento de 19.300 m³/dia, o que corresponde a cerca de 94000 habitantes equivalentes (SIMARSUL).

O sistema adotado baseia-se em lamas ativadas (média carga). Esta estação possui digestão anaeróbia de lamas com cogeração (402 kW) e possui tratamento terciário, com desinfecção com hipoclorito de sódio doseado no sistema. É garantido um sistema de desodorização nas infraestruturas (Simarsul, 2012).

O diagrama linear das várias etapas de tratamento na ETAR da Quinta do Conde, envolvendo a fase líquida e a fase sólida, foi elaborado através do AutoCad e está representado na Figura 3.3. e, com maior pormenor, na Figura Al.1 do Anexo I. O diagrama linear foi criado com base na informação disponível em trabalhos anteriores (Gouveia, 2018) e foi adaptado de acordo com a realidade atual, tendo em conta que a desinfecção é feita por doseamento de hipoclorito de sódio.



Legenda:

- 1) Grade grossa e Tamisador 2)Desarenador/Desengordurador 3)Decantador primário 4)Reator biológico 5)Decantador secundário
- 6)Desinfecção com hipoclorito 7)Espessador gravítico 8)Mesa de espessamento 9)Tanque de lamas mistas 10)Digestor anaeróbio
- 11)Centrifuga 12)Silo de lamas

Figura 3.3 - Diagrama Linear esquematizando o tratamento da fase líquida e da fase sólida na ETAR da Quinta do Conde.

Na ETAR podem-se distinguir três fases de tratamento: fase líquida, fase sólida e fase gasosa, as quais se podem associar diferentes operações (Tabela 3.13).

Exigência de Qualidade para Descarregar no Meio Recetor

O Estuário do Tejo recebe descargas de águas residuais de origem urbana e industrial, responsáveis pelas elevadas concentrações de nutrientes, matéria orgânica e organismos relacionados com a contaminação fecal (APA, 2007). Compete às ETAR reduzir aquelas concentrações para níveis aceitáveis, regulamentados por lei de acordo com o uso do efluente no meio recetor.

Tabela 3.13 - Fases de tratamento da ETAR.

| Fases de Tratamento | Principais operações e processos | |
|---------------------|---|-----------------------------|
| <u>Fase líquida</u> | Tratamento preliminar | Gradagem grossa |
| | | Tamizador |
| | | Desarenador/Desengordurador |
| | Tratamento primário | Decantação primária lamelar |
| | Tratamento secundário | Vala de oxidação |
| | | Decantação secundária |
| Desinfecção | Hipoclorito | |
| <u>Fase sólida</u> | Desidratação mecânica | |
| | Digestão anaeróbia | |
| | Espessamento gravítico e mecânico de lamas | |
| | Gasómetro | |
| | Cogeração | |
| <u>Fase gasosa</u> | Desodorização química | |

A ETAR da Quinta do Conde efetua a emissão do seu efluente no Esteiro de Coina, localizado no estuário do Tejo e classificado como uma zona sensível, pelo Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de junho, que também regulamenta a qualidade do efluente no meio recetor. Sendo o Esteiro de Coina uma zona de produção de bivalves, o tratamento do efluente deve garantir a remoção de coliformes fecais (CF), sendo desnecessária a remoção de nutrientes, segundo o Decreto-Lei n.º 198/2008 de 8 de outubro (Leite, 2014).

As exigências de qualidade para o efluente emitido, de acordo com o Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de junho são as seguintes:

- CBO₅ – 25 mg/l;
- CQO – 125 mg/l;
- SST – 35 mg/l;
- CF – 2000 NMP CF/100 ml.

3.3 Organismos utilizados e meio de cultura

3.3.1 Organismos utilizados

3.3.1.1 *Lemna minor*

Para a realização dos testes de ecotoxicidade utilizou-se a espécie *Lemna minor*, uma macrófita flutuante do género *Lemna* que pertence a família Lemnaceae. A sua dimensão reduzida, simplicidade estrutural, reprodução assexuada, tempo de geração curto, fazem com que estas plantas sejam bastantes convenientes para os ensaios laboratoriais (Wang, (1990,1986)). Na Figura 3.4 pode-se observar a *L. minor* num dos Erlenmeyers utilizados nos ensaios.



Figura 3.4 - Erlenmeyer com quatro plantas de *L. minor*.

3.3.1.2 *Chlorella vulgaris*

A espécie *Chlorella vulgaris* (Figura 3.5) é uma microalga do género *Chlorella*, que pertence a família das Chlorellaceae. A *C. vulgaris* foi escolhida como organismo experimental devido a vários fatores, dentro dos quais se pode mencionar a sua elevada taxa de crescimento e resistência a condições ambientais severas (Safi et al., 2014). O género *Chlorella* tem sido muito estudado, e tem demonstrado a sua eficiência na remoção de azoto e fósforo de águas residuais, com uma ampla gama de concentrações iniciais (Cai et al., 2013).



Figura 3.5 - Erlenmeyer com *C. vulgaris*.

3.3.1.3 *Daphnia magna*

Utilizou-se a espécie *Daphnia magna*, um microcrustáceo do género *Daphnia* que pertence à família das Daphniidae. A *D. magna* é um herbívoro zooplancónico, que ocupa uma posição importante em várias cadeias tróficas de ambientes aquáticos de água doce e a utilização eficaz do fitoplâncton, como fonte de alimento encontra-se bem documentada (e.g. Edmondson, 1982; Lampert et al., 1986). A escolha da *D. magna* teve como objetivo a avaliação da sua interação com a *L. minor* e *C. vulgaris*. Na Figura 3.6 observa-se um erlenmeyer contendo a *D. magna*. A seta na figura indica a localização de uma das várias *D. magna*. No canto superior direito desta figura pode observar-se com mais pormenor a *D. magna*.

A *D. magna* irá utilizar a microalga *C. vulgaris* como fonte de alimento (Munirasu et al., 2016), o que levará a uma alteração da dinâmica no crescimento das outras espécies utilizadas. A observação da interação entre o conjunto *D. magna* - *C. vulgaris*, *D. magna* - *L. minor*, *D. magna* - *L. minor* - *C. vulgaris* é um dos objetivos do 2º ensaio.

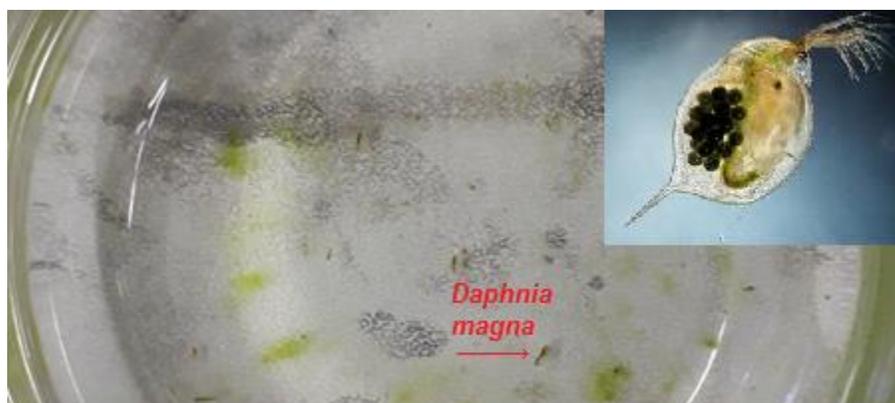


Figura 3.6 - Erlenmeyer com *D. magna*. Imagem aumentada da *D. magna* no canto superior direito

3.3.2 Meio de cultura

3.3.2.1 *Lemna minor*

Para a manutenção da cultura e para os testes de ecotoxicidade, utilizou-se o meio de cultura de Steinberg modificado (OECD, 2011), que foi preparado a partir de oito soluções stock e onde se utilizou água destilada na diluição. Todas as soluções-stock foram autoclavadas a 121 °C durante 20 minutos para esterilização, com exceção da solução oito. O pH do meio de cultura foi corrigido para $5,5 \pm 0,2$ como preconizado pela norma da OCDE nº 221. A composição e concentrações dos vários reagentes que constituem o meio de Steinberg modificado encontram-se na Tabela 3.14.

Tabela 3.14 - Composição e respetivas concentrações do meio de cultura da *L. minor* (OECD, 2011).

| Reagentes | Concentração | Unidades |
|--|--------------|----------|
| Solução stock 1 | | |
| KNO ₃ | 17,5 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 4,5 | g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 0,63 | g/l |
| Solução stock 2 | | |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 5,0 | g/l |
| Solução stock 3 | | |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 14,75 | g/l |
| Solução stock 4 | | |
| H ₃ BO ₃ | 120,0 | mg/l |
| Solução stock 5 | | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 180,0 | mg/l |
| Solução stock 6 | | |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 44,0 | mg/l |
| Solução stock 7 | | |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 180,0 | mg/l |
| Solução stock 8 | | |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 760,00 | mg/l |
| EDTA | 1500,00 | mg/l |

3.3.2.2 *Chlorella vulgaris*

A cultura de *C. vulgaris* foi realizada em meio de cultura Bold Basal modificado (Nichols & Bold, 1965; Stein, 1973). Na Tabela 3.15 encontra-se a composição do meio de cultura utilizado para *C. vulgaris*. Para a preparação de 1 l de meio de cultura utilizaram-se 10 ml da solução 1 e 1 ml das soluções 2 a 5. Após a

preparação do meio de cultura, o pH foi ajustado para o valor de 7. Durante o ensaio, o controlo é constituído por este meio de cultura.

Tabela 3.15 - Composição do meio de cultura Bold Basal modificado (Nichols & Bold, 1965; Stein, 1973).

| Reagentes | Concentração | Unidades |
|--|--------------|----------|
| Solução 1 | | |
| NaNO ₃ | 25 | g/l |
| NaCl | 2,5 | g/l |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 7,5 | g/l |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,5 | g/l |
| K ₂ HPO ₄ | 7,5 | g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 17,5 | g/l |
| Solução 2 | | |
| KOH | 31 | g/l |
| EDTA | 50 | g/l |
| Solução 3 | | |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 4,98 | g/l |
| H ₂ SO ₄ | 1 | ml/l |
| Solução 4 | | |
| H ₃ BO ₃ | 11,42 | g/l |
| Solução 5 | | |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,82 | g/l |
| MnCl ₂ .H ₂ O | 1,44 | g/l |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 1,19 | g/l |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 1,57 | g/l |
| Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 0,49 | g/l |

3.3.2.3 *Daphnia magna*

Apenas no 2º ensaio se utilizou a espécie *D. magna*. O meio utilizado para a amostra de controlo foi idêntico ao utilizado nas restantes amostras, onde esta espécie se encontrava presente. Este meio é composto pela água residual diluída a 25%, de acordo com as condições estabelecidas para o ensaio laboratorial.

3.4 Água residual utilizada nos ensaios

3.4.1 Amostragem da água residual

As amostras de água residual doméstica tratada foram recolhidas na ETAR da Quinta do Conde nos dias 15/7/19, 3/10/19 e 7/11/19, correspondentes a cada um dos ensaios efetuados: preliminar, 1º ensaio e 2º ensaio, respetivamente. A água residual tratada foi captada no fim da linha de tratamento, após a desinfecção com hipoclorito de sódio. De acordo com a logística das análises laboratoriais, as amostras foram congeladas, numa câmara frigorífica a uma temperatura aproximada de -18°C. Após os sete dias de ensaio, realizaram-se as análises de azoto total e fósforo total para as várias amostras.

3.4.2 Caracterização da água residual doméstica

A caracterização dos efluentes utilizados nos ensaios de acordo com a informação disponibilizada pela SIMARSUL (2019), encontra-se na Tabela 3.16.

Tabela 3.16 - Valores referentes aos efluentes utilizados nos ensaios (SIMARSUL, 2019).

| | pH | P total (mg P/l) | N total (mg N/l) |
|-------------------|-----|---------------------|---------------------|
| Ensaio Preliminar | 7,7 | 3,8 | 54 |
| 1º Ensaio | 7,5 | 8,7 | 44 |
| 2º Ensaio | 7,7 | 1,8 | 17 |

3.5 Metodologia geral dos ensaios

No âmbito deste trabalho foram realizados três ensaios, ensaio preliminar, 1º ensaio e 2º ensaio. Para cada ensaio foram previamente estabelecidas diferentes concentrações de água residual. Tendo-se utilizado três réplicas para cada concentração e controlo.

O ensaio preliminar serviu como ensaio teste. Neste ensaio pretendeu-se fazer uma avaliação preliminar da toxicidade e caracterização da água residual utilizada. No ensaio preliminar devido a questões de logística, apenas se utilizou a espécie *L. minor*. Neste ensaio, testaram-se as concentrações de água residual de 50%, 75% e 100%.

O 1º ensaio foi realizado com as espécies *L. minor* e *C. vulgaris*, onde se determinou a taxa de crescimento específico de *C. vulgaris* e de *L. minor* em amostras com as concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100%. Os resultados obtidos neste ensaio, relativamente às taxas de crescimento específico, permitiram estipular as condições experimentais do ensaio seguinte (2º ensaio), de forma a se obterem resultados relevantes no âmbito deste trabalho.

No 2º ensaio, além das espécies *L. minor* e *C. vulgaris* também se utilizou a espécie *D. magna*. Determinou-se a taxa de crescimento específico de *L. minor* e *C. vulgaris*, em amostras com as concentrações de água residual de 12,5% e 25%. Avaliou-se, ainda, o crescimento populacional da *D. magna*, assim como o crescimento desta espécie afeta, ou é afetado pela presença das espécies *C. vulgaris* e/ou *L. minor*, para amostras com uma concentração de 25% de água residual. Para tal, prepararam-se quatro tipos de amostras, 25% *Daphnia*, 25% *Daphnia*+*Chlorella*, 25% *Daphnia*+*Lemna* e 25% *Daphnia*+*Lemna*+*Chlorella*.

Nos três ensaios foi feita a avaliação da toxicidade, que consistiu na exposição de *L. minor* a diferentes concentrações de água residual. Estes ensaios decorreram num período de sete dias, durante o qual foi avaliada a inibição do crescimento desta macrófita. No 1º e 2º ensaio, também se avaliou o crescimento de *C. vulgaris* através de leituras diárias de absorvência, durante um período de sete dias. No final de cada um dos ensaios realizados (preliminar, 1º ensaio e 2º ensaio) determinou-se a concentração de nutrientes presentes em cada amostra combinada (junção das três réplicas numa única amostra).

Na Tabela 3.17 encontram-se os objetivos principais dos ensaios realizados.

Tabela 3.17 - Objetivos dos ensaios realizados

| Ensaio preliminar | 1º Ensaio | 2º Ensaio |
|---|---|--|
| Quantificação dos efeitos da água residual no crescimento de <i>L. minor</i> , para as concentrações de água residual de 50%, 75% e 100%. | Quantificação dos efeitos que a água residual utilizada tem no crescimento da <i>L. minor</i> e <i>C. vulgaris</i> , ao longo do período do ensaio, para as concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100%. | Quantificação dos efeitos que a água residual utilizada tem no crescimento da <i>L. minor</i> , <i>C. vulgaris</i> , ao longo do período do ensaio, para as concentrações de água residual de 12,5% e 25%. |
| | | Avaliação da interação entre as espécies <i>L. minor</i> , <i>D. magna</i> e <i>C. vulgaris</i> , para uma concentração de água residual de 25%. |

3.6 Ensaio toxicológico

O ensaio toxicológico que segue a norma nº 221 da OCDE tem como objetivo a quantificação dos efeitos que a água residual utilizada tem no crescimento da *L. minor* ao longo do período do ensaio.

O principal parâmetro utilizado na quantificação do crescimento de *L. minor* foi o número de frondes, mas também se utilizou a área foliar. Estipulou-se a área foliar, em vez de outro parâmetro (peso seco ou peso húmido), devido à facilidade de obtenção de valores para este parâmetro, através do tratamento da imagem fotográfica. As fotografias foram obtidas através da câmara fotográfica do telemóvel Samsung Galaxy modelo J3.

Antes de se iniciar o ensaio é necessário cumprir com determinadas condições, para que o teste de toxicidade seja válido, de entre as quais se destaca, o tempo de duplicação do número de frondes no controlo ser inferior a 2,5 dias (60 horas), o que corresponde aproximadamente a uma taxa de crescimento específico de $0,275 \text{ d}^{-1}$.

Durante o ensaio teve de se garantir uma fonte luminosa que providencie uma intensidade luminosa entre 6,5 e 10 klux, medida a uma distância equivalente à que separa a superfície das frondes da fonte luminosa. As diferenças de intensidade luminosa na área de teste não devem exceder $\pm 15 \%$.

A temperatura nos recipientes do teste deverá ser de $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH do meio de controlo, não deverá aumentar mais do que 1,5 unidades durante o teste.

É necessária a disposição aleatória dos recipientes do teste na incubadora, de forma a minimizar a influência espacial na intensidade luminosa ou na temperatura. Para isso utilizou-se o software R, versão 3.2.4, (R Foundation for Statistical Computing, 2016) na geração dos números aleatórios.

O ensaio é realizado num regime estático, ou seja, não existe renovação do meio. No teste de toxicidade utilizaram-se diferentes concentrações de água residual e um controlo, com três réplicas para cada uma, como sugerido pelo guia da OCDE (OECD, 2011).

Cada recipiente teste deverá conter entre 9 a 12 frondes, ou seja, entre três e quatro plantas com três frondes. O número de plantas e frondes tem de ser idêntico em cada recipiente teste.

O teste, ao ser realizado em regime estático, exige que o pH de cada amostra seja medido no início e final do ensaio.

3.7 Parâmetros de avaliação – *Lemna minor*

A norma nº 221 da OCDE (OECD 221,2006) refere duas variáveis de resposta:

Taxa de crescimento específico: esta variável de resposta é determinada com base nas variações do logaritmo do número de frondes, e adicionalmente, em termos das variações do logaritmo de outro parâmetro de medição (área foliar total, peso seco, peso húmido) nos controlos e grupo de tratamentos.

“Yield” ou rendimento: esta variável de resposta é determinada com base nas alterações do número de frondes, e adicionalmente, na base de outro parâmetro de medição (área foliar total, peso seco, peso húmido) nos controlos e grupo de tratamentos até ao final do teste. O Yield ou rendimento, é determinado pela expressão 3.2:

$$Yield = \frac{N_f - N_i}{N_i} \times 100 \quad [3.2]$$

- N_i - variável medida no recipiente de controlo ou teste no tempo inicial
- N_f - variável medida no recipiente de controlo ou teste no tempo final

A taxa de crescimento específico é calculada através da expressão 3.3:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t} \quad [3.3]$$

- μ_{i-j} - taxa de crescimento específico no intervalo de tempo i e j
- N_i - variável medida no recipiente de controlo ou teste no tempo i
- N_j - variável medida no recipiente de controlo ou teste no tempo j
- t – intervalo de tempo de i a j

Utilizando as taxas de crescimento específico estimadas pela expressão anterior é possível calcular a percentagem de inibição da taxa de crescimento específico (I_r) para cada concentração testada (grupo de tratamento) através da expressão 3.4:

$$\%I_r = \frac{(\mu_c - \mu_t)}{\mu_c} \times 100 \quad [3.4]$$

- $\% I_r$: percentagem de inibição da taxa de crescimento específico
- μ_c : valor médio para μ no controlo
- μ_t : valor médio para μ no grupo de tratamento

A variável de resposta yield é determinada com base em dois parâmetros de medição, o número de frondes e adicionalmente, na base de outro parâmetro de medição (área foliar total, peso seco, peso húmido) que se encontram presentes nos recipientes teste no início e no final do ensaio. A percentagem média de inibição em yield, é determinada para cada grupo de tratamento pela expressão 3.5:

$$\%I_y = \frac{(bc - bt)}{bc} \times 100 \text{ [3.5]}$$

- $\% I_y$: percentagem de redução em yield
- bc : biomassa final menos a biomassa inicial para o grupo de controlo
- bt : biomassa final menos a biomassa inicial para o grupo de tratamento

3.7.1 Número de frondes

A determinação do número de frondes (folhas) no início e final do ensaio, foi realizada com o apoio do software ImageJ (National Institute of Health, 2018), que permite o processamento de imagem de forma a delimitar as frondes, obtendo-se assim o número de frondes relativo a cada fotografia das amostras. As fotografias, onde a existência de microalgas dificulta a delimitação das frondes de cada planta, foram alteradas através do software GIMP (Kimball et al., 2014) e Microsoft Paint (Microsoft Corporation, 2013). A manipulação das imagens consistiu na eliminação das microalgas, de forma a ter imagens que, ao serem processadas pelo software ImageJ (Figura 3.7), irão permitir uma determinação correta do número de frondes.

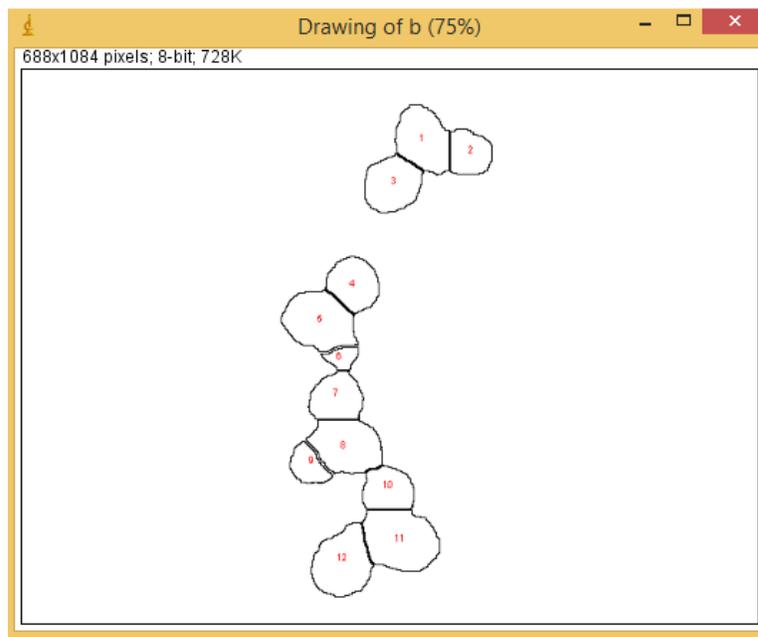
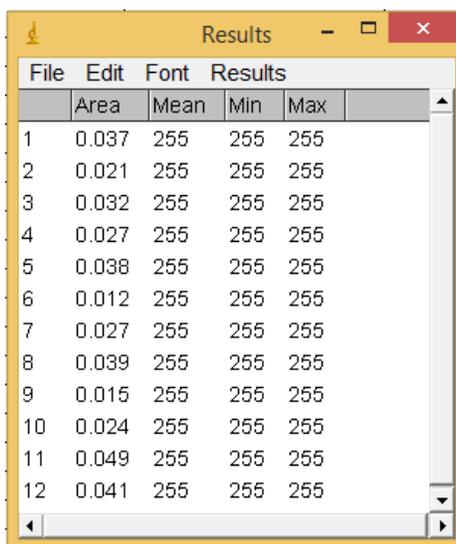


Figura 3.7 - Delimitação do número de frondes no software ImageJ (National Institute of Health, 2018).

3.7.2 Área foliar

Para a determinação da área foliar no início e final do ensaio, utilizaram-se os dados obtidos pelo software ImageJ (National Institute of Health, 2018). Definindo uma escala é possível determinar a área total de cada fronde, como se observa na Figura 3.8, onde na primeira coluna tem-se o número de referência para cada fronde e na segunda coluna a área foliar correspondente em cm².



| | Area | Mean | Min | Max |
|----|-------|------|-----|-----|
| 1 | 0.037 | 255 | 255 | 255 |
| 2 | 0.021 | 255 | 255 | 255 |
| 3 | 0.032 | 255 | 255 | 255 |
| 4 | 0.027 | 255 | 255 | 255 |
| 5 | 0.038 | 255 | 255 | 255 |
| 6 | 0.012 | 255 | 255 | 255 |
| 7 | 0.027 | 255 | 255 | 255 |
| 8 | 0.039 | 255 | 255 | 255 |
| 9 | 0.015 | 255 | 255 | 255 |
| 10 | 0.024 | 255 | 255 | 255 |
| 11 | 0.049 | 255 | 255 | 255 |
| 12 | 0.041 | 255 | 255 | 255 |

Figura 3.8 - Imagem da tabela com os resultados obtidos com o software ImageJ (National Institute of Health, 2018) para o número de frondes e área foliar (cm²).

3.8 Parâmetros de avaliação – *Chlorella vulgaris*

3.8.1 Absorvência

Para este trabalho experimental, selecionou-se a absorvência como parâmetro de avaliação do crescimento de *C. vulgaris*. Durante os ensaios foram feitas recolhas diárias de amostras e mediu-se a sua absorvência por meio de um espectrofotômetro UNICAM UV/Vis, modelo 5600. Foi selecionado o comprimento de onda de 683 nm por corresponder à máxima absorção na banda do vermelho do espectro visível (Wong, 2017, Rodrigues, 1990).

Os valores de absorvência a 683 nm, determinados ao longo dos sete dias de ensaio, foram convertidos na concentração de clorofila *a* através da utilização de uma reta de calibração (Figura 3.9). Esta reta de calibração permite inferir se existe proporcionalidade entre a concentração do analito e os valores obtidos no espectrofotômetro. Nesta figura, além do gráfico da reta de calibração é apresentada a respetiva equação e coeficiente de determinação. Os valores numéricos utilizados encontram-se na Tabela AII.1 do Anexo II.

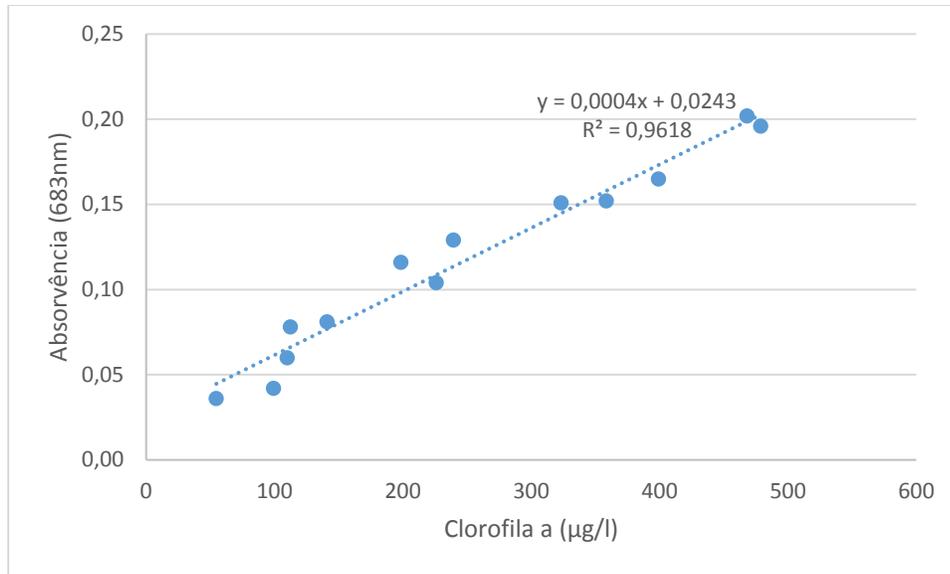


Figura 3.9 - Retas de calibração entre a absorvência e concentração de clorofila *a*.

O cálculo das taxas de crescimento específico de *C. vulgaris* para cada concentração de água residual, foi obtida usando os valores médios das três determinações efetuadas por dia, ao longo do período em que decorreram os ensaios. Na fase exponencial de crescimento da *C. vulgaris*, a concentração da clorofila *a*, pode ser aproximada pela expressão 3.6 (Wood et al., 2005).

$$C_t = C_0 \times e^{\mu t} \quad [3.6]$$

C_t – Concentração de clorofila *a* no final do intervalo de tempo (µg/l)

μ - Taxa de crescimento específico (dia⁻¹)

C_0 - Concentração de clorofila *a* no início do intervalo de tempo (µg/l)

t – Intervalo de tempo (dia)

A determinação da taxa de crescimento específico (μ) foi feita através do ajuste de uma reta aos valores, numa escala logarítmica, da concentração da clorofila *a* na fase exponencial de crescimento.

3.9 Procedimento experimental nos ensaios

Procedimentos comuns relativos aos ensaios envolvendo *L. minor*, *C. vulgaris* e *D. magna*

Nos ensaios realizados adicionaram-se aos erlenmeyers, com capacidade de 250 ml, diferentes volumes de água residual e de meio de cultura de modo a perfazer um volume de 100 ml. Os erlenmeyers foram, então, fechados com rolhas de algodão cardado, de modo a permitir as trocas gasosas entre o meio de

cultura e o exterior. As várias culturas foram posteriormente colocadas numa câmara de incubação que possui uma fonte de luz constituída por um sistema de seis lâmpadas fluorescentes, que permite uma iluminação contínua e uniforme do tipo branca fria, e que garantem que as culturas estejam expostas a uma intensidade luminosa de $6 \pm 1,5$ klux. A temperatura da câmara de incubação foi controlada através de um equipamento de ar condicionado que, refrigerando a sala, estabeleceu uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. De modo a minimizar a influência das diferenças espaciais na intensidade luminosa e na temperatura, as culturas foram colocadas de forma aleatória na incubadora, tendo-se utilizado o software R versão 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, 2016) na geração dos números aleatórios. A intensidade luminosa foi medida por intermédio do luxímetro Exttech LT300 e a temperatura com o aparelho Digital Thermo Hygrometer (HTC-2). Os ensaios decorreram durante um período de sete dias com um período de iluminação contínuo (24h/24h). No início, meio e fim de cada ensaio efetuou-se a medida do pH de todas as amostras, sendo utilizado o aparelho inoLab WTW series, pH/ION 735.

No final dos ensaios, todas as amostras foram congeladas a uma temperatura de aproximadamente -18°C , com vista à determinação das concentrações de fósforo total e azoto kjeldhal.

Na Tabela 3.18, encontram-se resumidas as condições pré-estabelecidas comuns aos vários ensaios.

Tabela 3.18 - Resumo das condições pré-restabelecidas comuns aos vários ensaios.

| Critério | Condição |
|--|---------------------------------|
| Tipo de teste | Estático |
| Temperatura ($^\circ\text{C}$) | 24 ± 2 |
| Intensidade luminosa (klux) | $6 \pm 1,5$ |
| Características da iluminação | Luz fluorescente branca fria |
| Fotoperíodo | Iluminação contínua |
| Recipiente Teste | Erlenmeyer de 250 ml |
| Volume de solução-teste | 100 ml |
| Duração do teste (dias) | 7 |
| Parâmetro medido | pH, Temperatura |

Procedimentos específicos para os ensaios envolvendo *L. minor*

No estudo de *L. minor* foram efetuados três ensaios: ensaio preliminar, 1º e 2º ensaio. As concentrações de água residual utilizadas foram de 50%, 75% e 100% para o ensaio preliminar, de 25%, 50%, 75% e 100%, para o 1º ensaio e de 12,5% e 25% para o 2º ensaio. A cada recipiente foram então adicionadas 4 plantas com três frondes uniformes. No início e no final dos ensaios fez-se a contagem do número de frondes e a determinação da área foliar através do software ImageJ (National Institute of Health, 2018).

Procedimentos específicos para os ensaios envolvendo *C. vulgaris*

O estudo de *C. vulgaris* envolveu a realização de dois ensaios: o 1º e 2º ensaio.

Na preparação das amostras com *C. vulgaris*, foi inoculado um volume de *C. vulgaris* em cada Erlenmeyer, que contém diferentes concentrações de água residual. As diluições da água residual nas amostras, foram

realizadas com o meio de cultura Bold Basal modificado, que foi também utilizado no controlo. As amostras e o controlo são cada uma constituída por três réplicas, perfazendo um total de 15 frascos erlenmeyer.

O estudo do crescimento da microalga envolveu a recolha diária de amostras, com o objetivo de se medir a densidade ótica para o comprimento de onda ótimo de absorção da microalga no espectrofotómetro UNICAM UV/Vis, modelo 5600).

No decorrer do ensaio efetuou-se a monitorização de alguns dos parâmetros físico-químicos, que influenciam o crescimento das microalgas, nomeadamente o pH e temperatura.

Na preparação das amostras de *C. vulgaris*, relativas ao 1º ensaio, o volume de *C. vulgaris* inoculado em cada erlenmeyer e respetivas réplicas foi de 30 ml com concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100%. No 2º ensaio foi inoculado um volume de *C. vulgaris* de 15 ml com concentrações de água residual de 12,5% e 25%.

Procedimentos específicos para o ensaio envolvendo *D. magna*

Neste ensaio estudaram-se quatro tipos de amostras que possuem uma concentração fixa de água residual de 25%. O primeiro tipo, só possui elementos da espécie *D. magna*, no segundo tipo, para além da *D. magna*, adicionou-se *L. minor*, o terceiro tipo de amostras envolve as espécies *D. magna* e *C. vulgaris* e por fim o quarto tipo possui *D. magna*, *C. vulgaris* e a *L. minor*. As quantidades das diferentes espécies nas amostras foram de 10 indivíduos de *D. magna*, um volume de *C. vulgaris* de 15 ml e quatro plantas de *L. minor* com 12 frondes.

Neste ensaio, o pH foi medido no início, em dois períodos intermédios (3º e 5º dia), e no final. Para as amostras com *C. vulgaris* foi feita a leitura diária da absorvência e efetuou-se a contagem do número de frondes para as amostras com *L. minor*. No final do ensaio foi feita a quantificação das *D. magna* por observação *in situ* do número de indivíduos presentes nos erlenmeyers.

Na Tabela 3.19 encontram-se resumidos os procedimentos específicos dos ensaios envolvendo *L. minor*, *C. vulgaris* e *D. magna*.

3.10 Determinação de fósforo total e azoto total nos ensaios realizados

Na determinação de fósforo total e azoto total, para os ensaios realizados no âmbito deste trabalho, foram usados o método digestão ácida com persulfato e o método de doseamento após mineralização com selénio, respetivamente (Clesceri et al.,1998).

A determinação das eficiências de remoção de fósforo e azoto foi feita através da expressão 3.7

$$\eta = \left(1 - \frac{c_f}{c_i}\right) \times 100 \quad [3.7]$$

η – Taxa de remoção do nutriente (%)

c_i – Concentração inicial do nutriente (mg/l)

c_f – Concentração final do nutriente (mg/l)

Tabela 3.19 - Resumo dos procedimentos específicos para as várias amostras.

| Espécie | Ensaio | Concentração de água residual | Parâmetro Medido |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------------|--|
| <i>L. minor</i> (L) | Preliminar | 50%, 75% e 100% | Nº de frondes;Área foliar;pH;Temperatura |
| | 1º Ensaio | 25%, 50%, 75% e 100% | |
| | 2º Ensaio | 12,5% e 25% | |
| <i>C. vulgaris</i> (C) | 1º Ensaio | 25%, 50%, 75% e 100% | Absorvência;pH;Temperatura |
| | 2º Ensaio | 12,5% e 25% | |
| <i>D. magna</i> (D) | 2º Ensaio | 25% | Nº de indivíduos; pH;Temperatura |
| D+L | 2º Ensaio | 25% | Nº de indivíduos; Nº de frondes; Área foliar;pH;Temperatura |
| D+C | 2º Ensaio | 25% | Nº de indivíduos; Absorvência;pH;Temperatura |
| D+L+C | 2º Ensaio | 25% | Nº de indivíduos;Absorvência Nº de frondes;Área foliar;pH; Temperatura |

3.11 Análise Estatística

Utilizou-se o software Microsoft Office Excel 365 (Microsoft Corporation, 2019), para o tratamento estatístico dos resultados (média, desvio padrão e teste ANOVA). Para se verificar a existência de diferenças entre as médias das taxas de crescimento é utilizado o teste ANOVA, fator único (teste F).

A existência de diferenças entre médias é comprovada quando o $F_{crítico}$ obtido é menor que F ($F_{crítico} < F$), caso contrário, não existirão diferenças entre médias. Para o cálculo de $F_{crítico}$ e F , no teste ANOVA, é utilizado o fator único. Caso existam diferenças entre médias, utiliza-se o software R versão 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, 2016) para determinar quais são os pares de médias que são estatisticamente diferentes através do teste de Tukey, que permite avaliar a magnitude dessas diferenças. O script utilizado no software R versão 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, 2016) para efetuar o teste de Tukey encontra-se no Anexo VIII.

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaio Preliminar

Na altura em que o ensaio teve início, a cultura de *C. vulgaris* não se mostrou viável, tendo-se apenas utilizado como espécie teste, a macrófita *L. minor*. Tinha-se previsto testar quatro concentrações de água residual (25%, 50%, 75% e 100%) e um controlo, com três réplicas para cada concentração e controlo, mas só foi possível usar apenas três concentrações (50%, 75% e 100%) e um controlo com as respetivas réplicas. A razão desta diminuição do número de concentrações teste, deveu-se à quantidade limitada de plantas disponíveis, em virtude de a mudança de meio de *L. minor* ter sido feita próximo do início do ensaio preliminar. Devido ao pequeno número de plantas, ficou-se condicionado na escolha de plantas idênticas em termos do número de frondes e de dimensões. Deste modo, a distribuição das plantas nos vários erlenmeyers não foi totalmente homogénea. Por lapso, foi utilizada água destilada como meio de cultura para o controlo, que não é favorável ao crescimento de *L. minor* (Saeger, 1925).

Segundo a norma da OCDE nº221, o teste ecotoxicológico só é válido se a taxa de crescimento específico do controlo for maior do que $0,275 \text{ d}^{-1}$. Tendo-se obtido uma taxa de crescimento específico de $0,178 \text{ d}^{-1}$ (Figura AIII.2 do Anexo III), o teste não é válido. Antes do início do ensaio, durante a manutenção da cultura de *L. minor* com meio de Steinberg modificado, obteve-se uma taxa de crescimento específico que se encontra dentro dos parâmetros de validação do teste ($0,431 \text{ d}^{-1}$). A norma diz que o meio de cultura Steinberg modificado é adequado, já o uso da água destilada como meio de cultura no controlo não está de acordo com a norma, o que levou à não validação do teste.

Os diversos problemas experimentais anteriormente descritos, levaram a decisão de não se comentar os dados obtidos no ensaio preliminar, devido a uma incerteza acrescida, que tornam estes dados pouco significativos, para obtenção de interpretações científicas relevantes. Os dados obtidos para o ensaio preliminar encontram-se nos Anexos III, IV, V e VI.

4.2 1º Ensaio

4.2.1 Temperatura e pH

Na Figura 4.1 encontra-se representada a evolução da temperatura ao longo dos sete dias de ensaio, para as amostras com *L. minor* e *C. vulgaris*.

De acordo com a norma nº 221 da OCDE (OECD, 2006), a temperatura durante o período de tempo que decorre o ensaio deverá ser $24 \pm 2^\circ \text{C}$. A temperatura ao longo do período de ensaio está de acordo com o intervalo de temperatura sugerido para o ensaio toxicológico, como se observa pela Figura 4.1 e os valores respetivos encontram-se resumidos na Tabela AIV.3 do Anexo IV. A temperatura média durante o ensaio foi de aproximadamente 24°C .

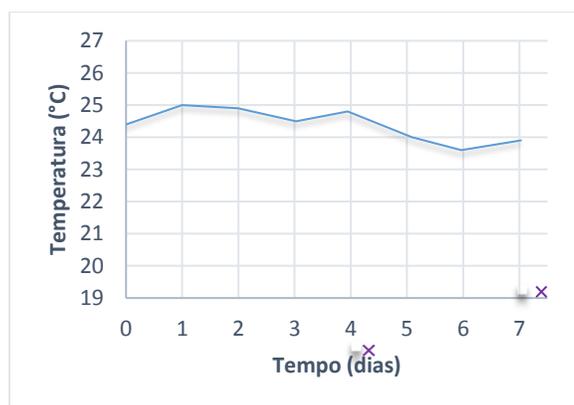


Figura 4.1 - Evolução da temperatura ao longo dos sete dias de ensaio.

A evolução dos valores de pH ao longo do período de ensaio para as amostras com *L. minor*, e várias concentrações de água residual, encontra-se representada na Figura 4.2.

Na Figura 4.2 (A) observa-se que os valores de pH para a amostra de controlo da *L. minor*, estão compreendidos entre 7,5 (valor inicial) e 5,4 (valor final), sendo a variação dos valores de pH de 2,1 unidades (valores do pH na Tabela AIV.3 do Anexo IV). Segundo Cunha et al. (2010), a variação na temperatura altera o valor do pH no meio, geralmente o pH diminui cerca de 0,1 unidades, quando a temperatura é superior a 20 °C (Sawyer et al., 2003).

De acordo com a norma da OCDE, o pH do meio nos controlos de *L. minor*, não deverá aumentar mais do que 1,5 unidades, mas caso haja uma oscilação superior a 1,5 unidades, não invalida o ensaio toxicológico. No 1º ensaio, a oscilação de pH de – 2,1 poderá ser justificada, por se ter utilizado por lapso água destilada como meio de cultura nos controlos, em vez de utilizar um dos meios referidos na norma nº 221 da OCDE (OECD 221,2006) para o ensaio toxicológico.

Na Figura 4.2 (B, C, D e E), os valores de pH das amostras com *L. minor* e concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100% respetivamente, aumentam ao longo do ensaio e têm aproximadamente um valor de 7,5 no início do ensaio e de 10 no final do ensaio.

Na Figura 4.3 observam-se os valores de pH ao longo do tempo para as amostras com *C. vulgaris*, e várias concentrações de água residual. O aumento dos valores de pH verificado está diretamente relacionado com o aumento da atividade fotossintética (Alyabyev et al., 2007; Huo et al., 2012), como se constata na Figura 4.4, onde se mostra a evolução da concentração de clorofila *a* para as amostras correspondentes. As amostras com as concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100% tiveram uma variação de pH idêntica, onde os valores aproximados de pH no início e final do ensaio, foram de 8 e 10 respetivamente. O pH no controlo (Figura 4.3 (A)) aumentou entre o primeiro dia (7,4) e o terceiro dia (8,8) do ensaio. A partir do terceiro dia verificou-se uma diminuição do pH até ao último dia do ensaio, em que tomou o valor de 7,2. Os valores obtidos para o pH encontram-se na Tabela AIV.3 do Anexo IV.

4.2.2 Clorofila *a*

Nas Figuras 4.4 e 4.5 apresentam-se os valores das concentrações de clorofila *a* (µg/l), ao longo de 7 dias para as amostras com *C. vulgaris*, em meio de cultura Bold Basal modificado e água residual com as concentrações de 25%, 50%, 75% e 100%.

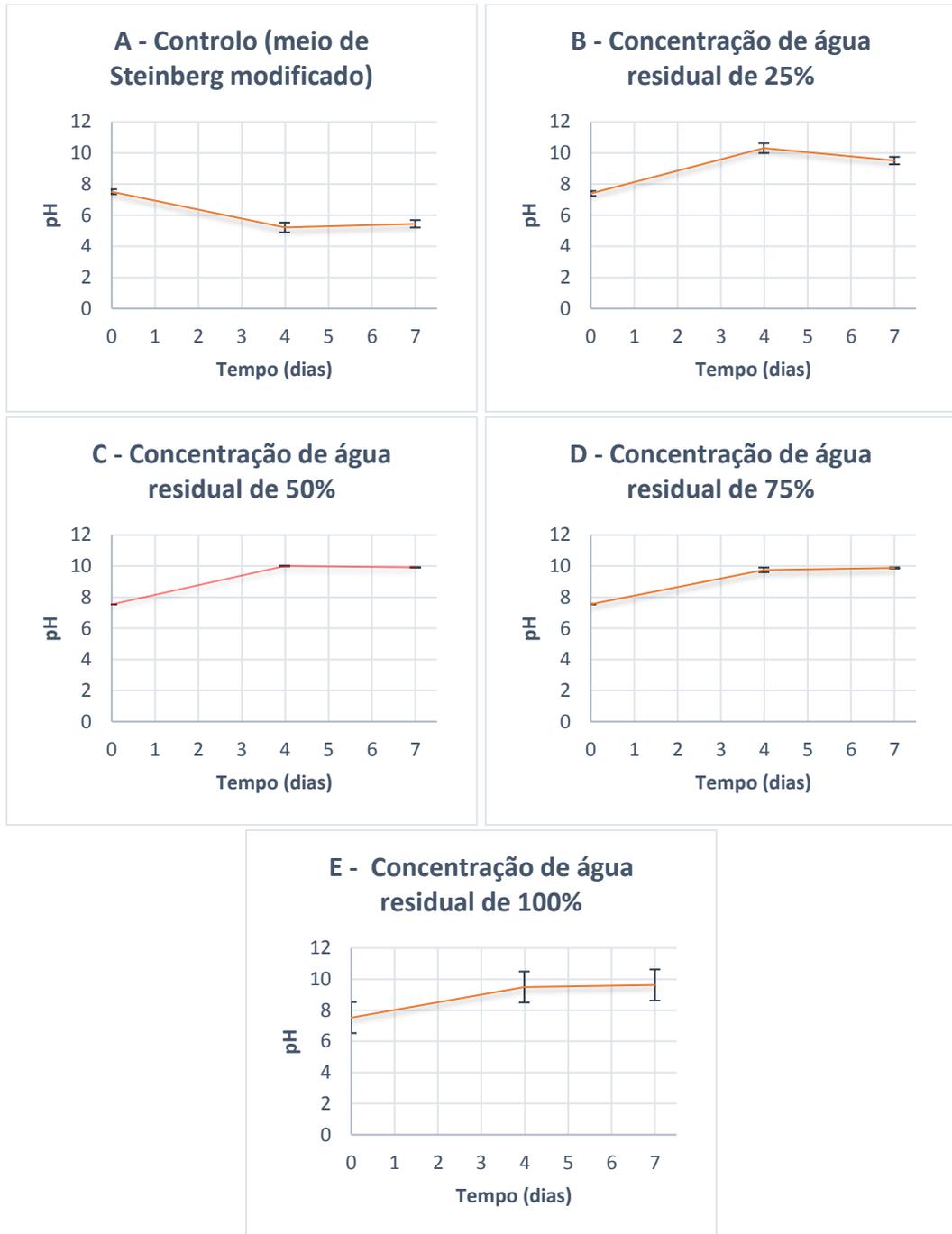


Figura 4.2 - Valores do pH ao longo de 7 dias para as amostras com *L. minor* (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

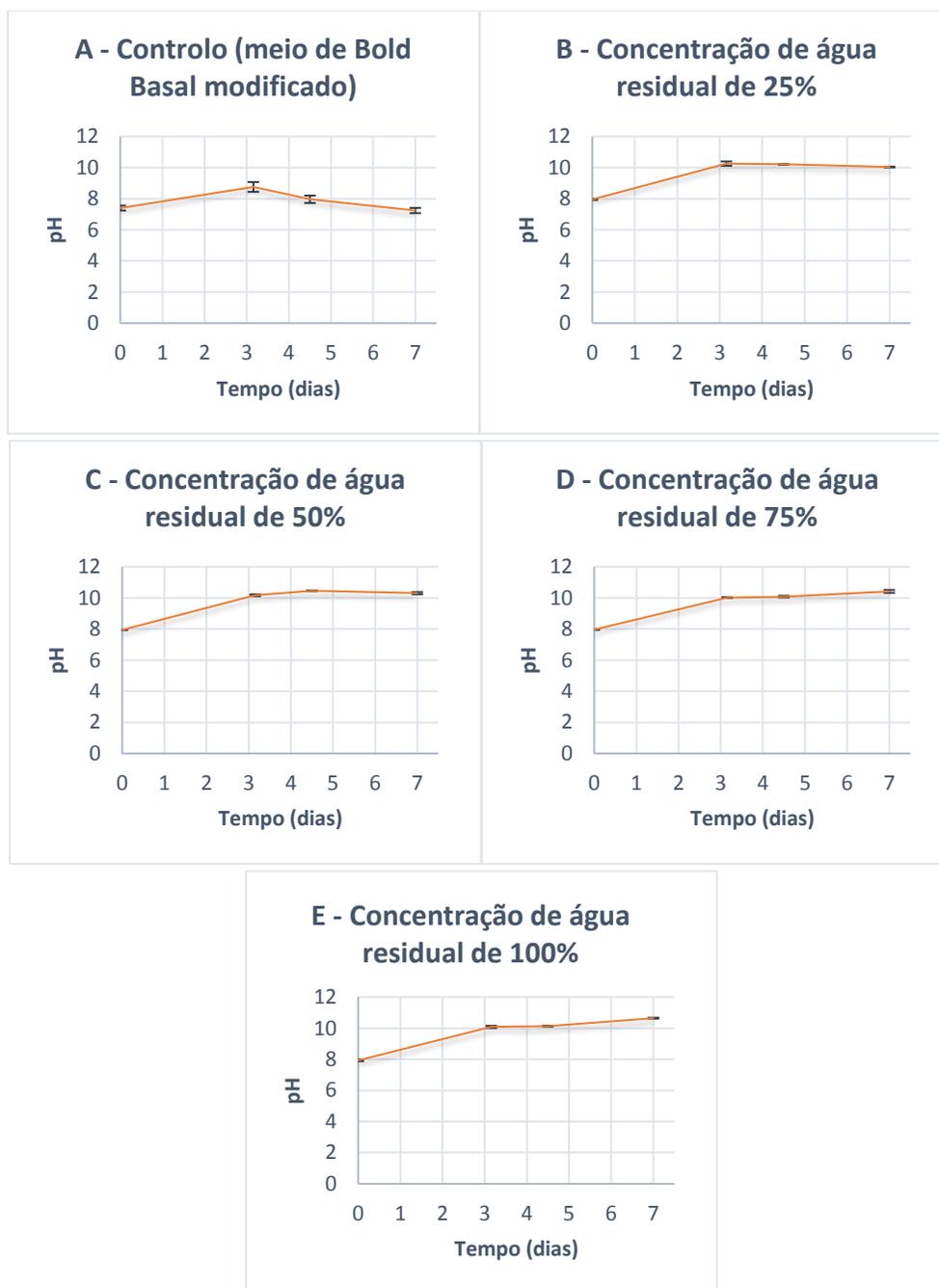


Figura 4.3 - Valores de pH ao longo do ensaio para *C. vulgaris* (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

O crescimento de *C. vulgaris* nas várias amostras não apresentou uma fase lag significativa, o que indica que as microalgas se adaptaram rapidamente aos meios e utilizaram os nutrientes disponíveis, resultando numa fase lag curta como observado por Yu et al. (2019). Através da análise da Figura 4.5 observa-se que foi na amostra com uma concentração de 25 % de água residual, Figura 4.5 (B), que

a *C. vulgaris* apresentou o valor mais elevado para a concentração da clorofila *a* (1732 µg/l ao fim de 6 dias).

Os valores das concentrações de clorofila *a* (µg/l), ao longo dos sete dias do ensaio, para as várias amostras encontram-se na Tabela AII.4 do Anexo II.

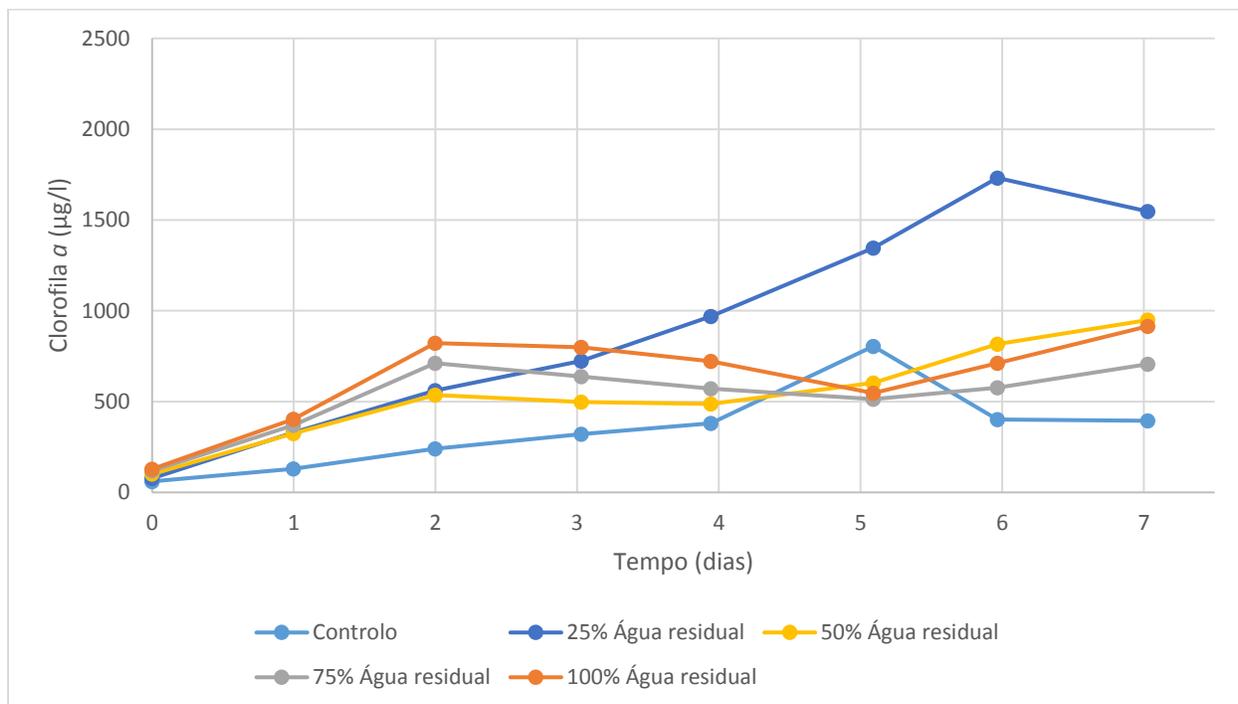


Figura 4.4 - Concentração média de clorofila *a* ao longo do tempo para *C. vulgaris* e várias concentrações de água residual.

Na Figura 4.5 observam-se, separadamente, os valores da concentração de clorofila *a* para a média dos triplicados de cada amostra, com os desvios padrão respetivos. A inclusão da Figura 4.5 teve como finalidade auxiliar na interpretação dos resultados obtidos para as várias amostras, já que seria difícil representar na Figura 4.4, os desvios padrão de uma forma diferenciada para cada amostra. Verifica-se que os valores máximos da concentração de clorofila *a*, para as várias amostras podem ser obtidos, em tempos diferentes durante o período de ensaio. Assim, na amostra de controlo (Figura 4.5 (A)) o valor máximo (805 µg/l) é atingido ao fim de cinco dias, na amostra com uma concentração de 25% de água residual (Figura 4.5 (B)), o valor máximo (1732 µg/l) é atingido ao fim de 6 dias e nas amostras com concentrações de água residual de 50%, 75% e 100% (Figura 4.5 (C, D e E)), os valores máximos de clorofila *a* (949 µg/l, 706 µg/l e 915 µg/l) são observados ao fim de sete dias. Os valores das absorvências para cada amostra, a partir dos quais se obtiveram os valores para a concentração da clorofila *a*, encontram-se na Tabela AIV.6 do anexo IV.

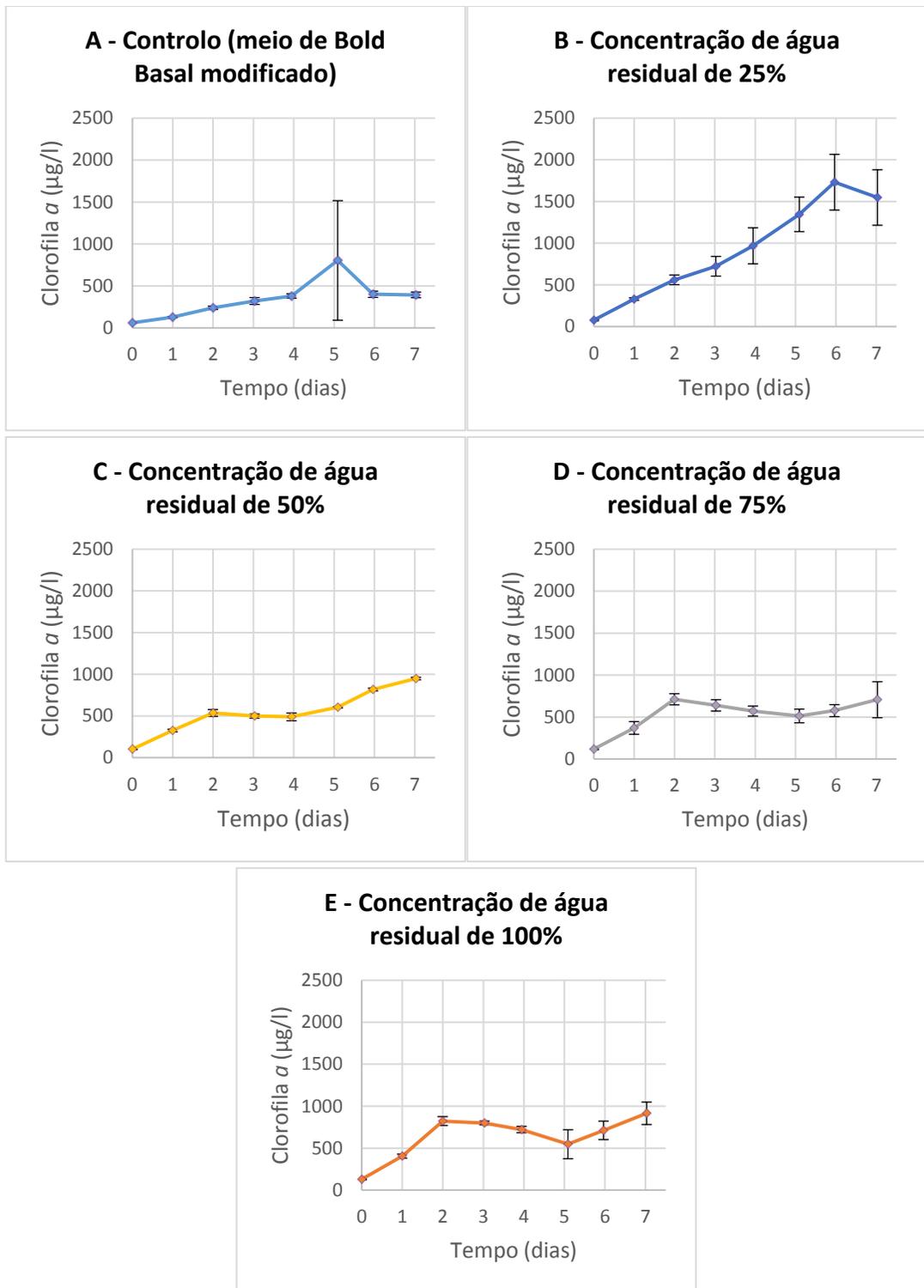


Figura 4.5 - Valores da concentração de clorofila a ao longo de 7 dias para as amostras com *C. vulgaris* (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

4.2.3 Taxas de crescimento específico

4.2.3.1 *L. minor*

Podem-se observar na Figura 4.6, os valores da taxa de crescimento específico da *L. minor* para o número de frondes, em amostras com várias concentrações de água residual, verificando-se que a taxa de crescimento específico mais elevada ($0,205 \text{ dia}^{-1}$) foi obtida no controlo. Com o aumento da concentração de água residual houve uma diminuição da taxa de crescimento específico.

Nos meios de cultura com água residual, a maior taxa de crescimento específico ($0,149 \text{ dia}^{-1}$) ocorreu para o meio de cultura com menor concentração de água residual (25%), enquanto que o menor valor observado ($-0,013 \text{ dia}^{-1}$) foi obtido para o meio de cultura com a maior concentração de água residual (100%). Pode-se, pois concluir que com o aumento da concentração da água residual, houve inibição do crescimento da *L. minor*. As taxas de crescimento específico negativas para as concentrações de água residual de 75% e 100%, indicam que algumas plantas morreram. Embora não se tenha utilizado a mesma água residual, os resultados obtidos estão de acordo com as conclusões do trabalho de Žaltauskaitė et al. (2014), onde foi reportado que as plantas morreram, quando expostas a concentrações mais elevadas de água residual tratada (50-100%). Por sua vez, na amostra com 25% de água residual, o número de frondes foi significativamente inferior ao da amostra de controlo. Os valores das taxas de crescimento específico em termos do número de frondes, encontram-se na Tabela AIII.2 do Anexo III.

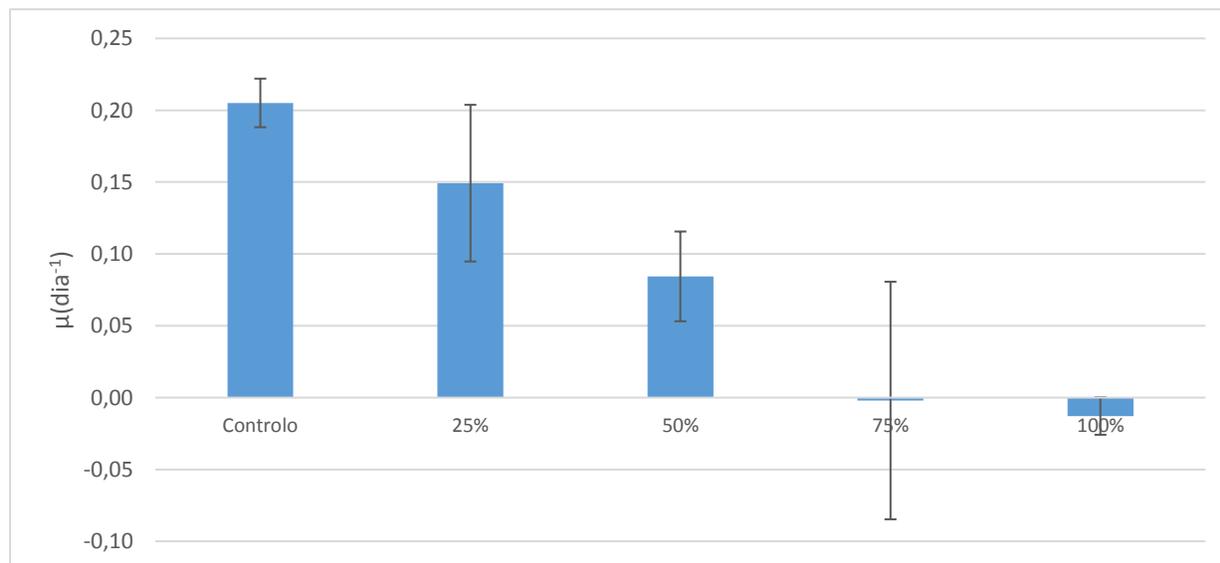


Figura 4.6 - Taxa de crescimento específico da *L. minor* para o número de frondes e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas entre as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes, realizou-se o teste ANOVA, fator único. Analisando os valores obtidos (Tabela 4.1), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) obtido é menor que o F (11,91), pelo que existem diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico das amostras, para um grau de confiança de 95%.

Outra forma de verificar se existem diferenças entre médias é pela interpretação do valor obtido para p, que neste caso é inferior ao grau de significância (0,05).

Tabela 4.1 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com *L. minor*, envolvendo o número de frondes.

| Fonte de variação | SQ | GI | MQ | F | P | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|-------------|----------|-----------|
| Entre grupos | 0,107091 | 4 | 0,026773 | 11,90887564 | 0,000807 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,022481 | 10 | 0,002248 | | | |
| Total | 0,129573 | 14 | | | | |

De forma a verificar, quais as diferenças entre pares de amostras nos ensaios com *L. minor*, realizou-se o teste de Tukey através do software R versão 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, 2016), tendo-se obtido os resultados para o valor de p apresentados, na Tabela AVII.1 do Anexo VII, e a Figura 4.7. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95%, para cada um dos vários pares de amostras. Todos os intervalos de confiança que contêm o valor zero, não são estatisticamente significativos, o zero indica que não há evidência da diferença entre o par de amostras (Greenwood, 2020). De acordo com a figura e a tabela, observa-se que todos os pares de grupos, com exceção de 25%-100%, Controlo-100%, 75%-25% e Controlo-75%, não apresentam diferenças estatisticamente significativas.

A Figura 4.8 referente ao yield do número de frondes, tem uma evolução idêntica à da Figura 4.6, que mostra a taxa de crescimento específico para o número de frondes. A taxa de crescimento específico diminui com o aumento da concentração de água residual. Os valores do yield do número de frondes, encontram-se na Tabela AIII.1 do Anexo III.

Pode-se observar na Figura 4.9, referente à taxa de crescimento específico para a área foliar, que a taxa de crescimento específico mais elevada (0,159 dia⁻¹) foi obtida no controlo. Com o aumento da concentração de água residual houve uma diminuição da taxa de crescimento específico, como também já se tinha observado no caso do número de frondes.

Para os meios de cultura com água residual, a maior taxa de crescimento específico (0,151 dia⁻¹) ocorreu para o meio de cultura, com menor concentração de água residual (25%), enquanto que o menor valor observado (-0,004 dia⁻¹) foi obtido para o meio de cultura, com a maior concentração de água residual (100%).

As taxas de crescimento específico em termos de área foliar, para a amostra de controlo (0,159 dia⁻¹) e de 25% (0,151 dia⁻¹) de água residual têm valores próximos. O mesmo acontece, quando se compara o valor médio da taxa de crescimento específico da amostra de 75% (0,003 dia⁻¹), com o da amostra de 100% (-0,004 dia⁻¹) de água residual. Esta proximidade de valores entre amostras, demonstra que a área foliar média para os pares de amostras é idêntica, o que não se verifica para o número de frondes, como se observa quando se comparam as Figuras 4.6 e 4.9. Os valores das taxas de crescimento específico em termos da área foliar, encontram-se na Tabela AIII.4 do Anexo III.

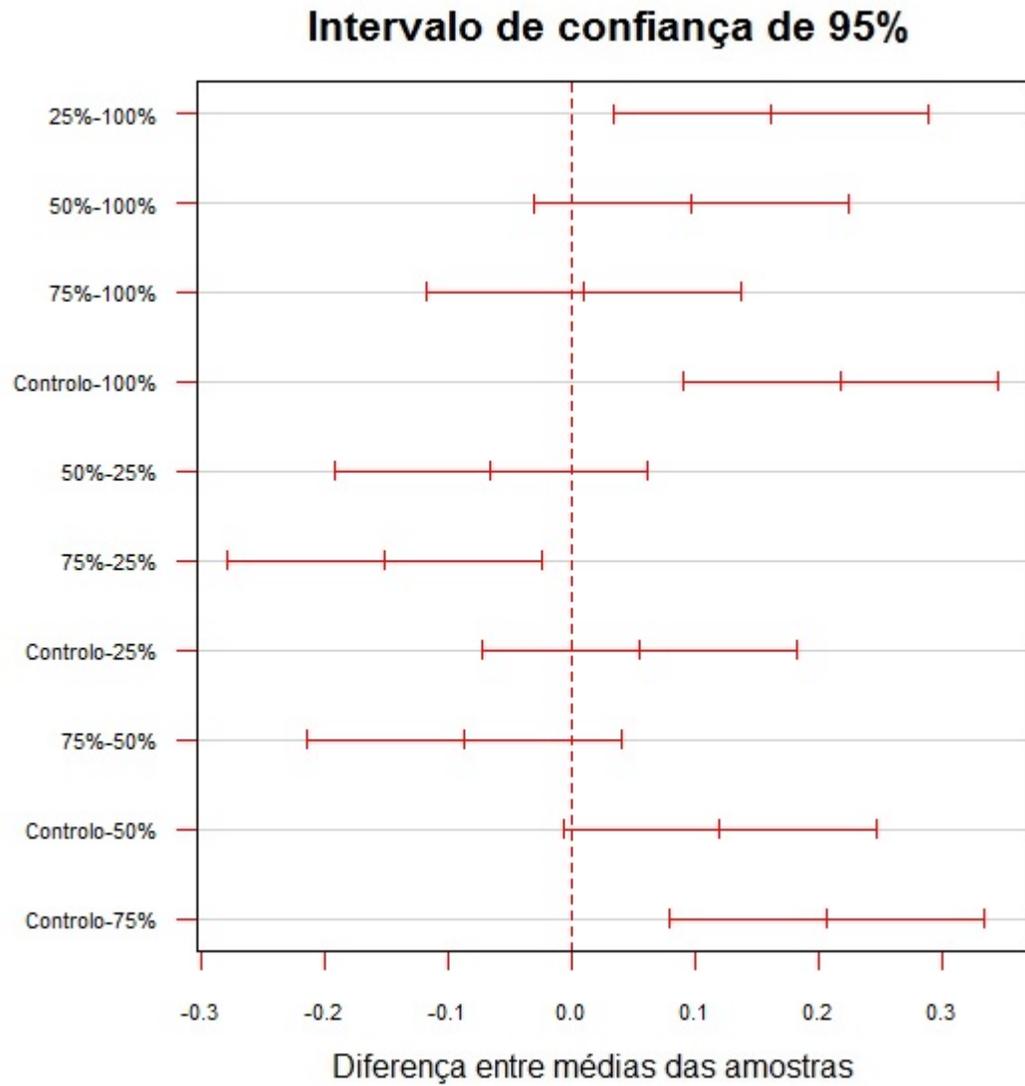


Figura 4.7 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes.

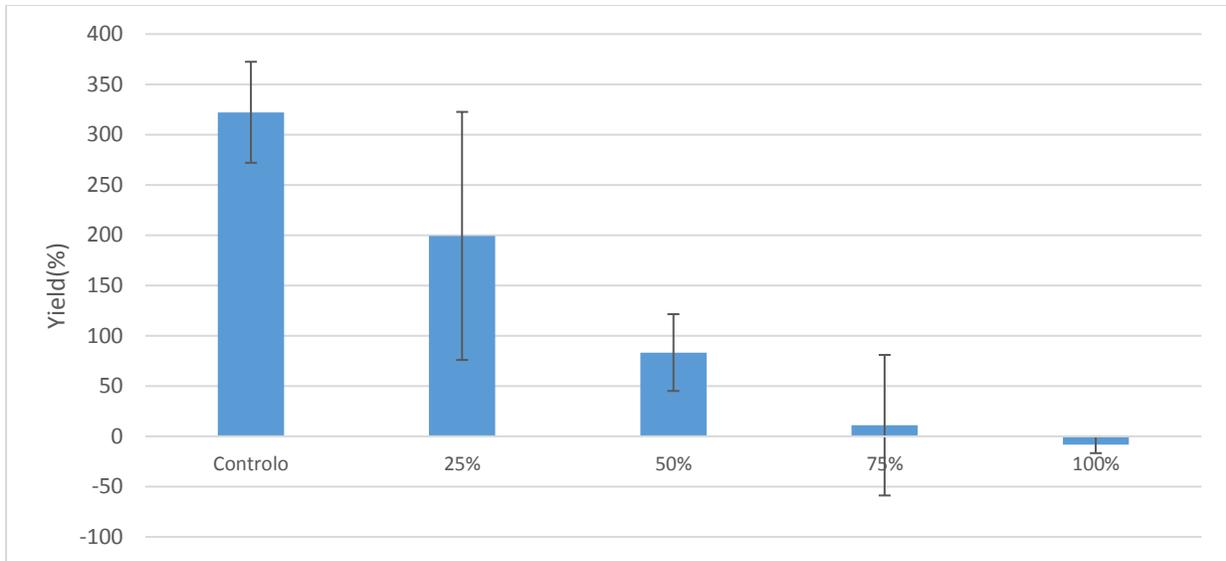


Figura 4.8 - Yield do número de frondes para a *L. minor* e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

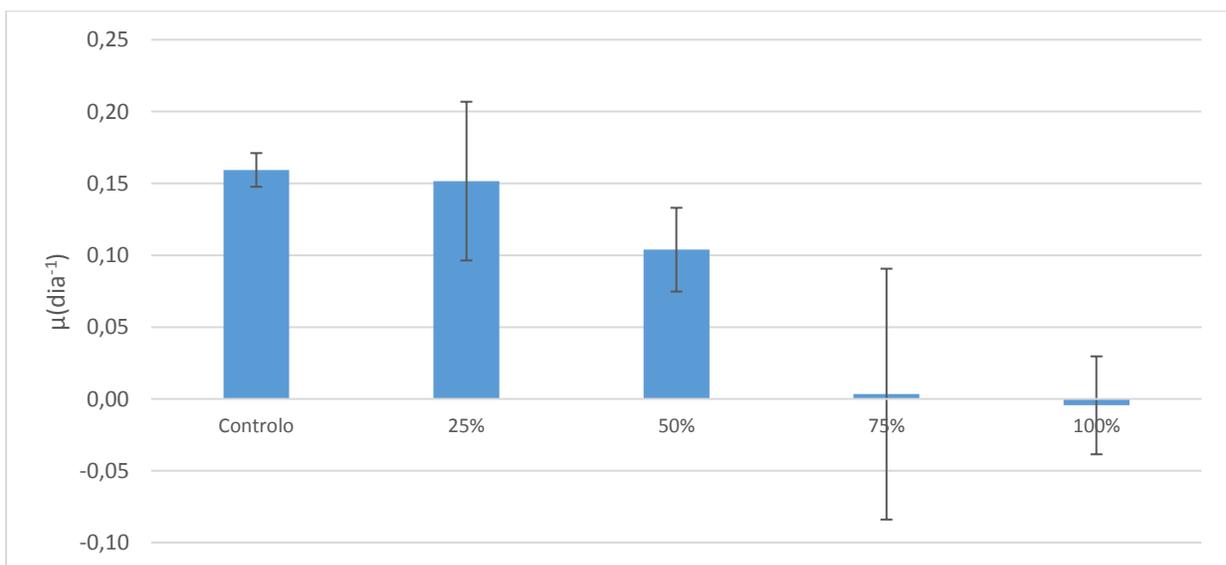


Figura 4.9 - Taxa de crescimento específico da *L. minor* para a área foliar e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas, entre as taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar, realizou-se a análise de variância, ANOVA (fator único). Analisando os valores obtidos (Tabela 4.2), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) obtido é menor que o F (7,30), pelo que existem diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico para cada grupo de amostras, para um grau de confiança de 95%.

Tabela 4.2 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com *L.minor*, envolvendo a área foliar.

| Fonte de variação | SQ | GI | MQ | F | p | $F_{\text{crítico}}$ |
|-------------------|----------|----|----------|-------------|----------|----------------------|
| Entre grupos | 0,074896 | 4 | 0,018724 | 7,302210921 | 0,005099 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,025642 | 10 | 0,002564 | | | |
| Total | 0,100538 | 14 | | | | |

Foi efetuado o teste de Tukey tendo-se obtido os resultados para o valor de p, apresentados na Tabela AVII.2 do Anexo VII, e a Figura 4.10. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95% para cada um dos vários pares de amostras. De acordo com a figura, observa-se que os pares de grupos, com exceção de 25%-100%, Controlo-100%, 75%-25% e Controlo-75%, não apresentam diferenças significativas em termos estatísticos.

A Figura 4.11 referente ao yield da área foliar é idêntica à Figura 4.9 da taxa de crescimento específico para a área foliar. Os valores do yield da área foliar, encontram-se na Tabela AIII.4 do Anexo III.

4.2.3.2 *C. vulgaris*

As taxas de crescimento específico calculadas na fase exponencial de crescimento de *C. vulgaris*, para as várias amostras encontram-se representadas na Figura 4.12. Pode-se observar que, a taxa de crescimento específico com o valor mais reduzido corresponde ao controlo (0,356 dia⁻¹), e verifica-se que, com o aumento da concentração da água residual, há um aumento da taxa de crescimento específico, sendo a amostra com 100% de água residual a que teve o valor mais elevado (0,930 dia⁻¹). Os valores das taxas de crescimento específico, para as várias amostras encontram-se na Tabela AII.5 do Anexo II. Os resultados obtidos para as taxas de crescimento específico, possuem ordens de grandeza idênticas às indicadas por vários trabalhos envolvendo a *C. vulgaris*, que se situam no intervalo 0,7-2 d⁻¹ (Lakaniemi et al., 2012).

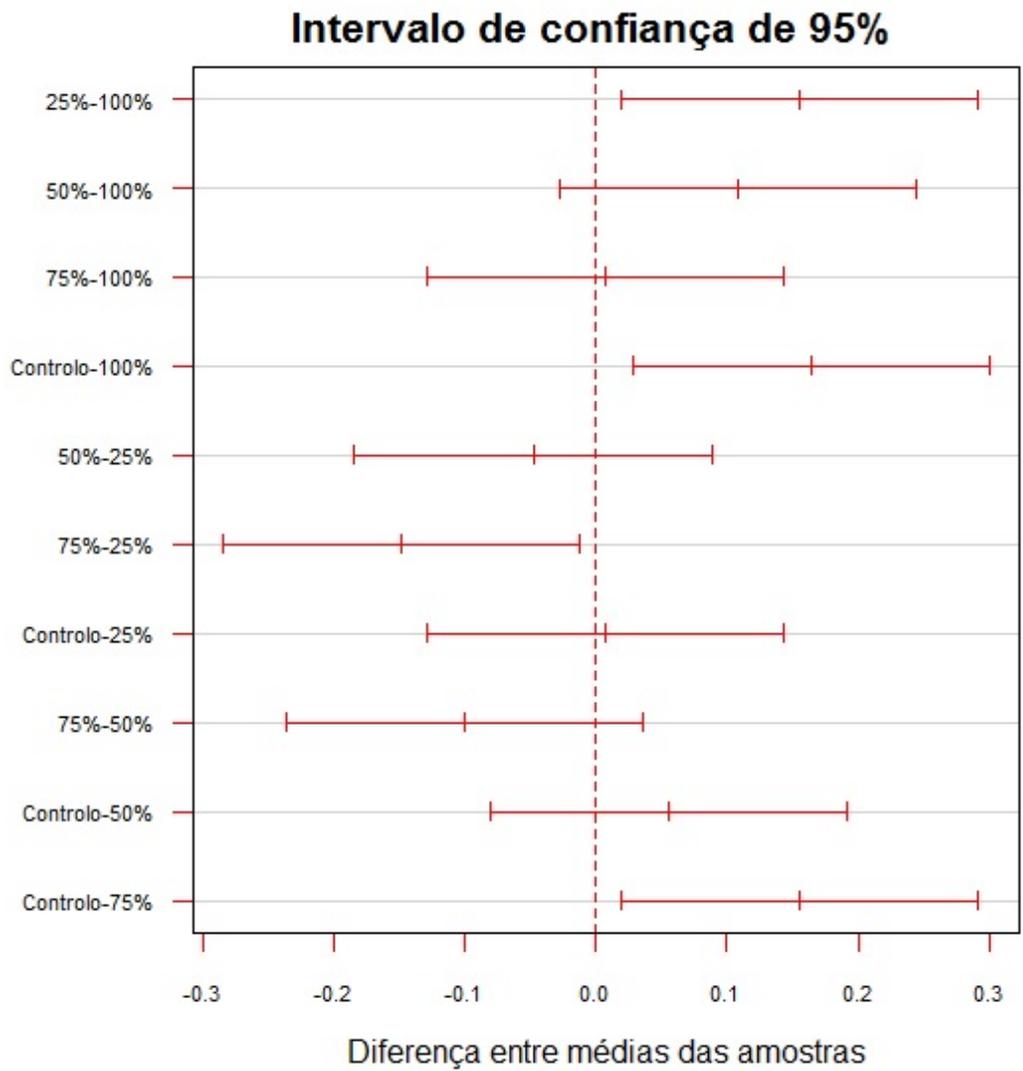


Figura 4.10 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para as taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar.

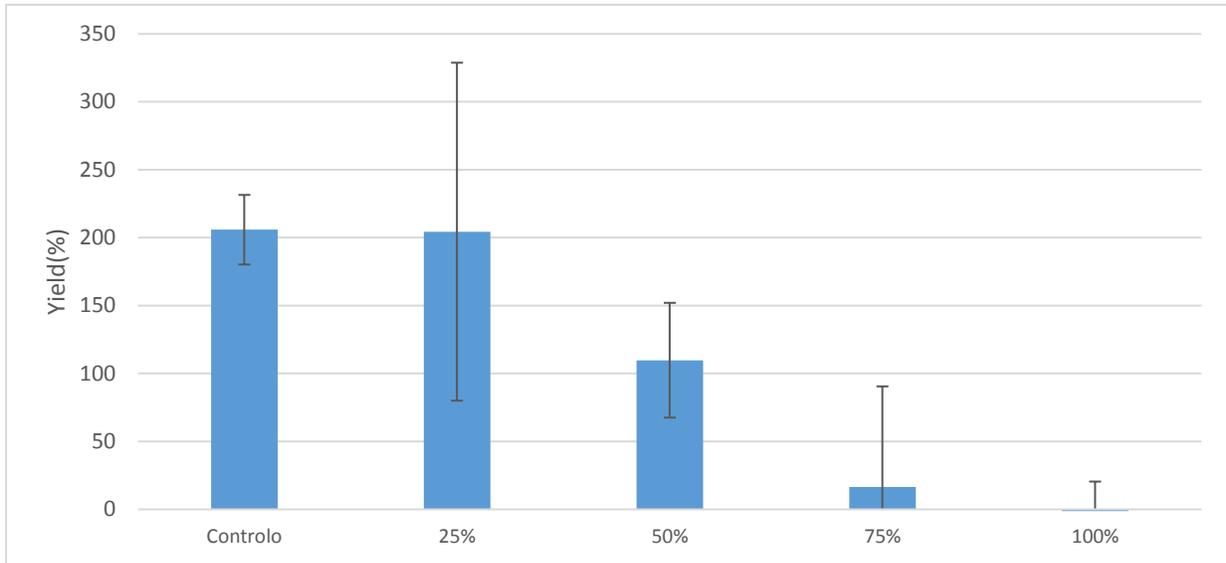


Figura 4.11 - Yield da área foliar para a *L. minor* e várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

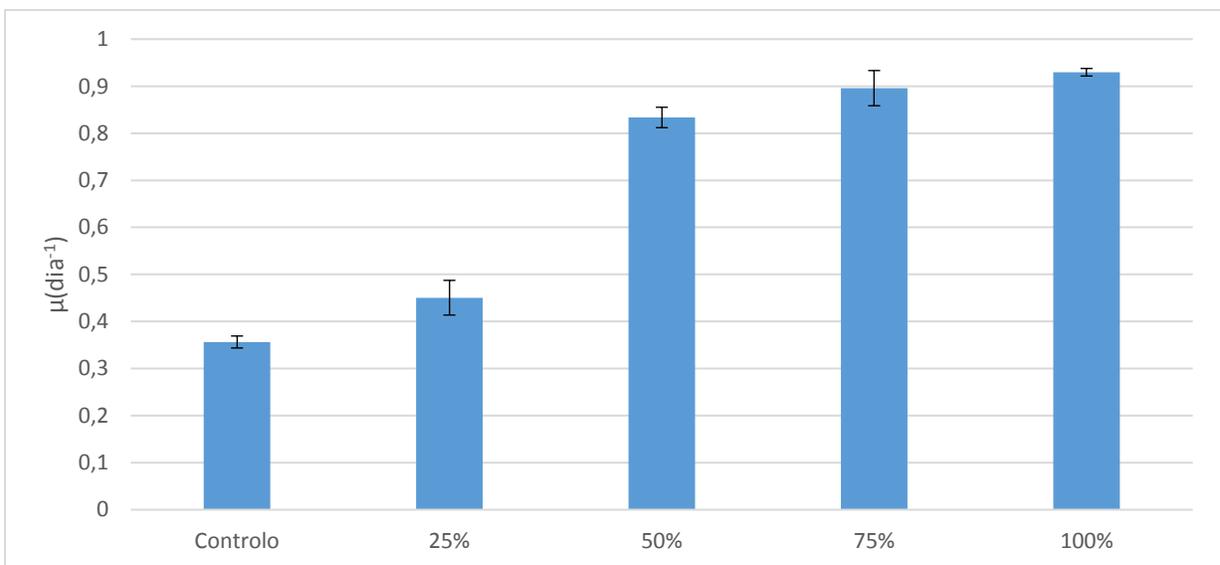


Figura 4.12 - Taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas, entre as taxas de crescimento específico obtidas para as várias amostras de *C. vulgaris*, realizou-se a análise de variância, ANOVA (fator único). Analisando os valores obtidos (Tabela 4.3), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) obtido é menor que o F (314,35), pelo que existem diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico para cada grupo de amostras, para um grau de confiança de 95%.

Tabela 4.3 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 1º ensaio com *C.vulgaris*.

| Fonte de variação | SQ | GI | MQ | F | p | $F_{\text{crítico}}$ |
|-------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------------------|
| Entre grupos | 0,867342 | 4 | 0,216836 | 314,3462 | 1,82E-10 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,006898 | 10 | 0,00069 | | | |
| Total | 0,87424 | 14 | | | | |

Foi efetuado o teste de Tukey tendo-se obtido os resultados para o valor de p, apresentados na Tabela AVII.3 do Anexo VII, e a Figura 4.13. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95% para cada um dos vários pares de amostras e observa-se que os pares de grupos, com exceção de 25%-100%, 50%-100%, Controlo-100%, 50%-25%, 75%-25%, Controlo-25%, Controlo-50% e Controlo-75%, não apresentam diferenças significativas em termos estatísticos.

4.3 2º Ensaio

4.3.1 Temperatura e pH

No 2º ensaio foi pré-estabelecida uma temperatura de 24 ± 2 °C, como é sugerido na norma nº 221 da OCDE (OECD 221,2006) para o ensaio toxicológico. Contudo, devido às condições ambientais inerentes ao período em que o ensaio foi realizado, o trabalho experimental foi efetuado a uma temperatura que variou entre 22,5 °C e 20 °C. A evolução da temperatura ao longo dos sete dias de ensaio, encontra-se representada na Figura 4.14 e os valores respetivos encontram-se resumidos na Tabela AIV.7 do Anexo IV.

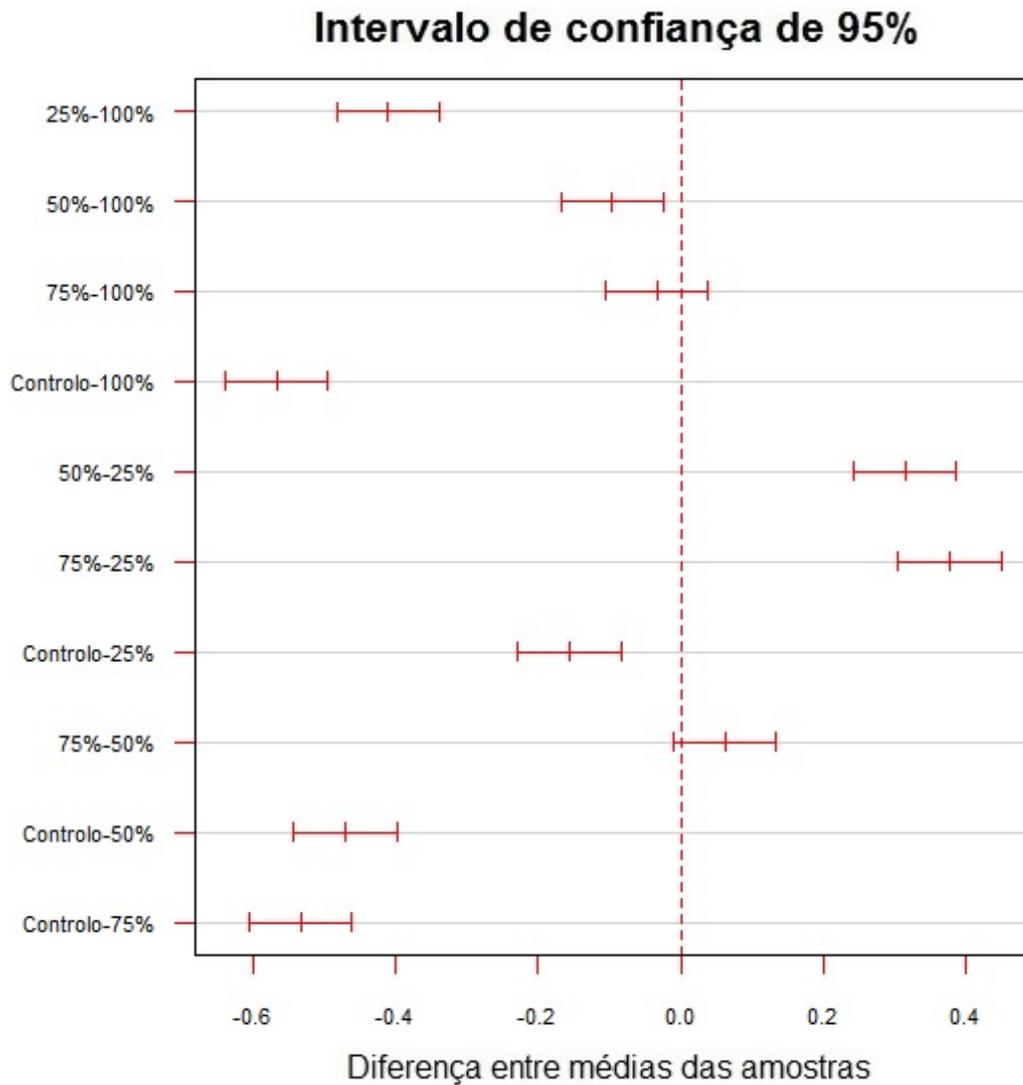


Figura 4.13 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para a *C. vulgaris*.

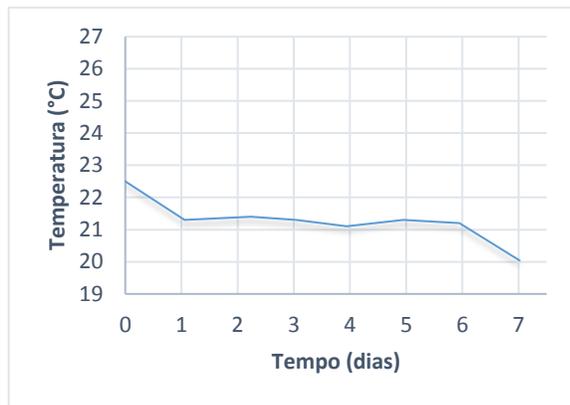


Figura 4.14 - Evolução da temperatura ambiente ao longo do ensaio.

A evolução dos valores de pH ao longo do período de ensaio, para as amostras constituídas pela espécie *L. minor* e para várias concentrações de água residual, encontra-se representada na Figura 4.15. Na Figura 4.15 (A), relativa ao controlo, os valores de pH aumentam durante toda a duração do ensaio, tendo um valor inicial de 5,3 e final de 8,3. Os valores do pH são apresentados na Tabela AIV.8 do Anexo IV.

De acordo com a norma da OCDE, o pH da amostra de controlo neste ensaio não deverá aumentar mais do que 1,5 unidades, o que não se verificou. Esta oscilação dos valores de pH, acima do que a norma estipula, poderá ser explicada pela contaminação da amostra por microalgas. Com vista a reduzir a eventual proliferação de microalgas, aumentou-se a frequência de mudança do meio de cultura. Contudo não foi possível inibir o seu crescimento, como se observa na Figura 4.16 referente ao início (A) e ao final (B) do ensaio.

Na Figura 4.15 (B e C), para concentrações de água residual de 12,5% e 25%, verifica-se também um aumento dos valores de pH ao longo do ensaio. No início, as amostras de *L. minor*, têm aproximadamente um valor de pH de 7,4 e, no final do ensaio, apresentam um valor de pH de 8,8 e 9,8 para as concentrações de água residual de 12,5% e 25%, respetivamente.

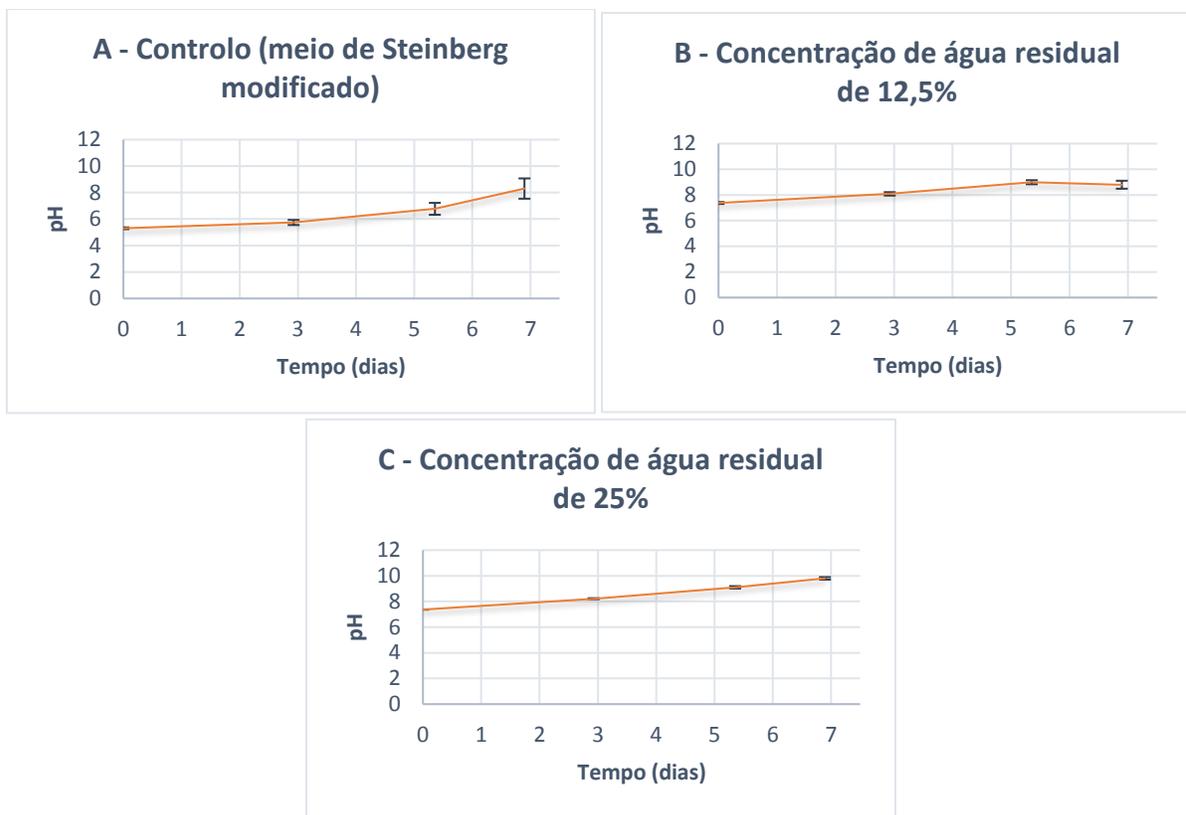


Figura 4.15 - Valores do pH ao longo de 7 dias para as amostras com *L. minor* (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

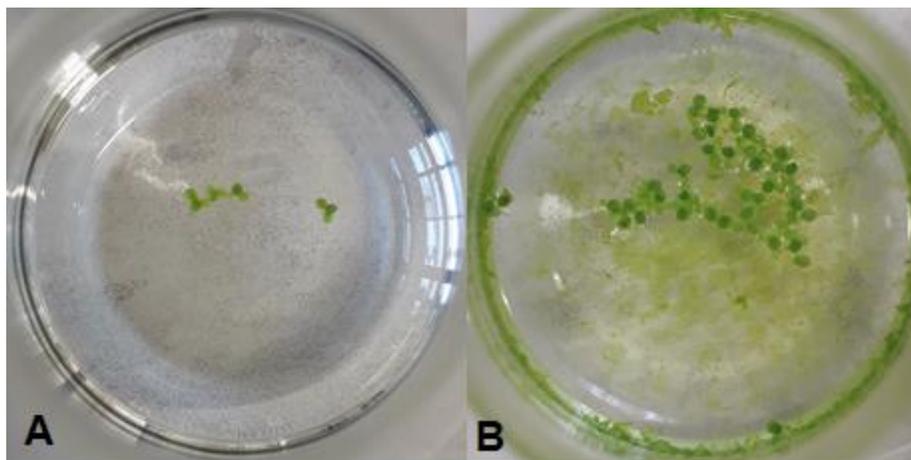


Figura 4.16 - Erlenmeyer com amostra de controlo com *L. minor*. A-Início do ensaio; B- Final do ensaio (7dias);

Na Figura 4.17 apresentam-se os valores de pH, ao longo dos sete dias do ensaio, para as amostras com *C. vulgaris*, de acordo com os vários valores da concentração de água residual. O valor do pH da amostra de controlo (Figura 4.17 (A)) no início do ensaio foi de 7,4 e no final de 7,7. As amostras com as concentrações de água residual de 12,5% e 25% (Figura 4.17 (B, C)), tiveram uma variação de pH idêntica, onde os valores aproximados de pH, no início e final do ensaio, foram de 7,4 e 10 respetivamente. O

aumento do valor de pH verificado está diretamente relacionado com a atividade fotossintética (Alyabyev et al., 2007; Huo et al., 2012). Os valores obtidos para o pH encontram-se na Tabela AIV.8 do Anexo IV.

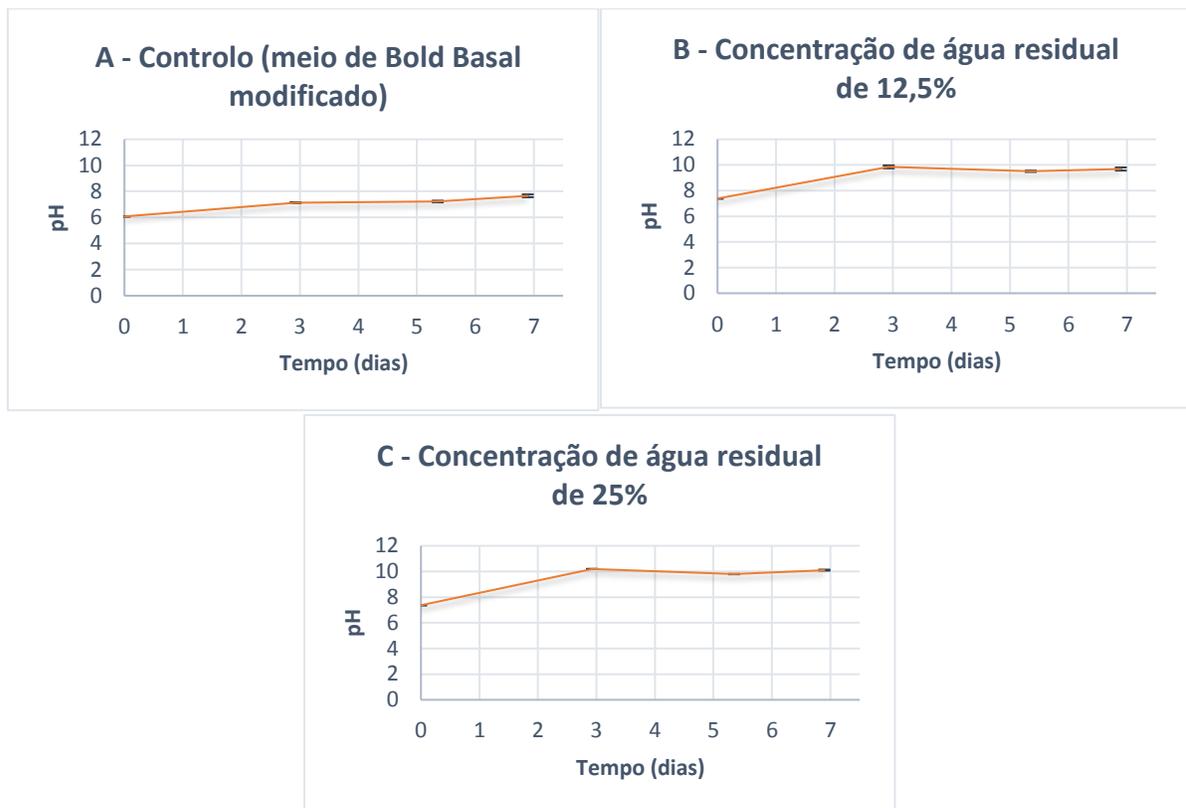


Figura 4.17 - Valores do pH para as amostras do 2º ensaio com *C. vulgaris*.

Na Figura 4.18 observam-se os valores de pH ao longo dos sete dias do ensaio, para amostras com concentrações de água residual de 25% envolvendo a espécie *D. magna* (Figura 4.18(A)), *Daphnia+Lemna*, *Daphnia+Chlorella* e *Daphnia+Lemna+Chlorella* (Figura 4.18 (B, C e D)). Os valores de pH da amostra constituída apenas por *D. magna* (Figura 4.18 (A)) foram de 7,4 no início e de 8,8 no final dos ensaios. As amostras envolvendo *D. magna* e uma outra espécie, tiveram uma variação de pH idêntica, em que os valores de pH no início e final do ensaio, foram aproximadamente de 7,4 e 10, respetivamente. Os valores obtidos para o pH encontram-se na Tabela AIV.8 do Anexo IV.

4.3.2 Clorofila a

Na Figura 4.19 encontram-se os valores da concentração de clorofila a, ao longo dos sete dias em que decorreu o ensaio, para as amostras de *C. vulgaris* envolvendo o controlo e as concentrações de água residual de 12,5% e 25%, e para as amostras de *Daphnia+Chlorella* e *Daphnia+Lemna+Chlorella* com concentração de água residual de 25%. As várias amostras tiveram um crescimento sem uma fase lag significativa, o que indica que as microalgas se adaptaram rapidamente ao meio e utilizaram os nutrientes disponíveis, resultando numa fase lag curta, como observado no ensaio anterior e no trabalho de Yu et al., (2019).

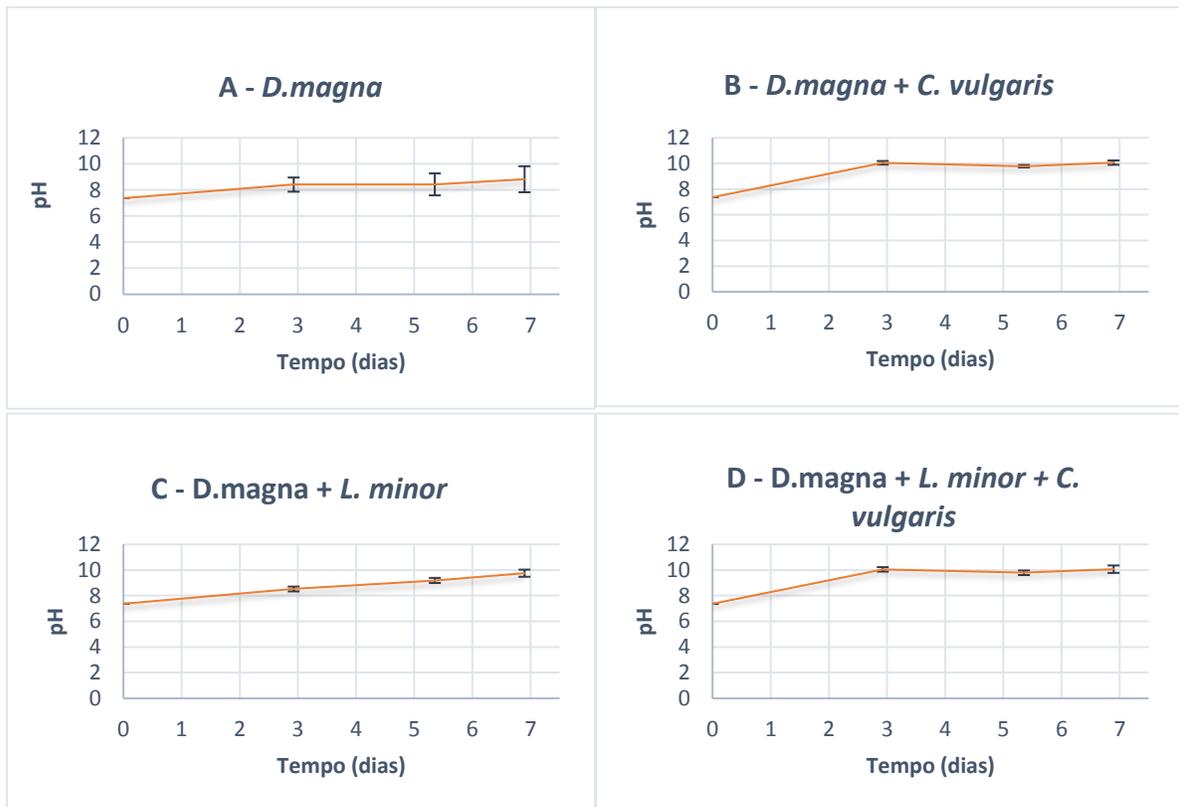


Figura 4.18 - Valores de pH para as amostras com *D. magna* e uma concentração de água residual de 25% (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

A análise da Figura 4.19 evidencia um aumento da concentração de clorofila *a*, para todas as amostras em estudo, durante o período do ensaio. A amostra de *C. vulgaris*, com concentração de água residual de 25%, teve o valor diário mais elevado para a concentração de clorofila *a* (2122 µg/l no final do ensaio). O trabalho de Onay (2018), em que foi utilizada uma água residual com as concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% e o controlo com meio Bold Basal, mostrou que a concentração de água residual de 50% era a mais adequada para o crescimento de *C. vulgaris*. A diferença de resultados poderá ser devida a água residual e o meio nutriente do controlo não serem idênticos aos do trabalho efetuado no âmbito desta tese.

Os valores das concentrações de clorofila *a* (µg/l) ao longo de 7 dias encontram-se na Tabela AII.8 do Anexo II.

Na Figura 4.20 estão representados os gráficos das concentrações de clorofila *a*, para amostras com *C. vulgaris*, e os respetivos desvios padrão. Em todas as amostras, a concentração máxima de clorofila *a* verifica-se ao fim de sete dias. A amostra de controlo é a que possui o menor valor da concentração máxima de clorofila *a* e uma evolução da concentração de clorofila diferente da observada para as restantes amostras, durante o período do ensaio. A amostra de *C. vulgaris* com uma concentração de 25% de água residual, é a que possui valor máximo de concentração de clorofila *a*. Quando se comparam as amostras com concentração de água residual de 25%, e que diferem em termos das espécies presentes

(*Daphnia+Chlorella* e *Daphnia+Lemna+Chlorella*), constata-se, pela Figura 4.20 (D e E), que após o quarto dia de ensaio, têm concentrações de clorofila *a* com valores relativamente próximos. Os valores das absorvências para cada amostra, utilizados na determinação das concentrações de clorofila *a*, encontram-se na Tabela AII.8 do Anexo II.

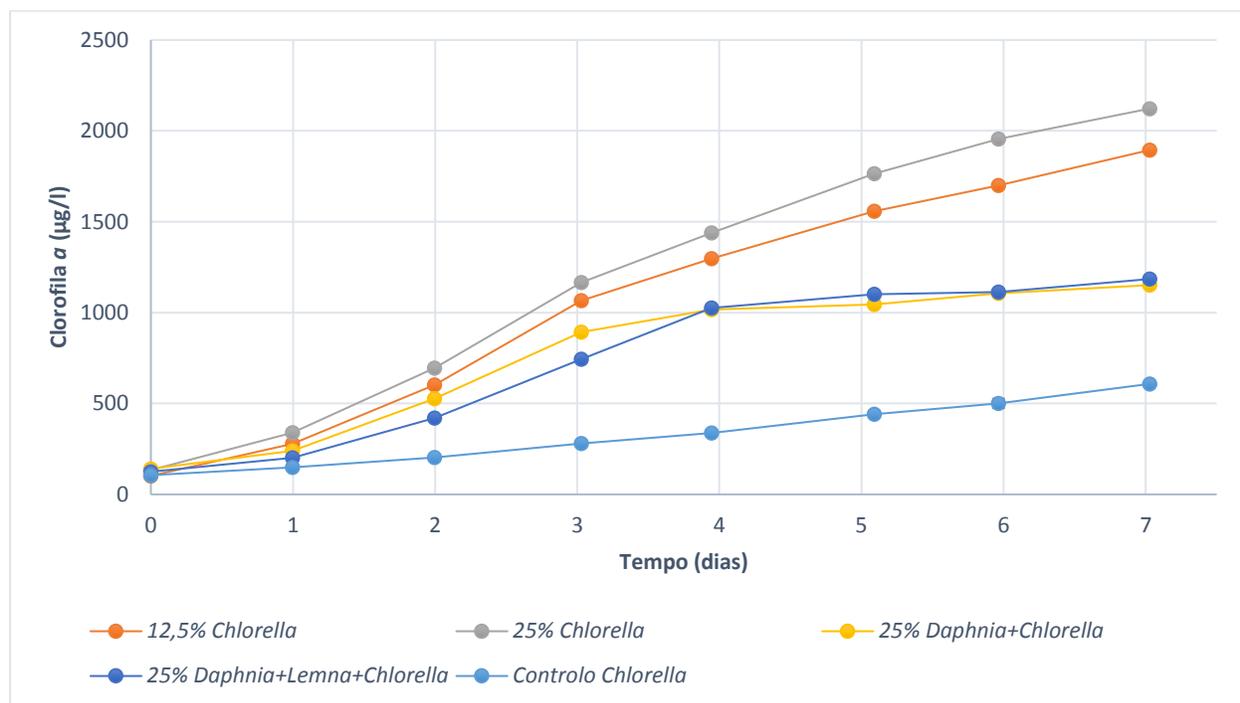


Figura 4.19 - Concentrações de clorofila *a* ao longo do tempo para *C. vulgaris* e várias concentrações de água residual.

4.3.3 Taxas de crescimento específico

4.3.3.1 *L. minor*

Na Figura 4.21 mostra-se a taxa de crescimento específico do número de frondes, para diversas amostras com *L. minor* e várias concentrações da água residual. Verifica-se que a taxa de crescimento específico mais elevada ($0,294 \text{ dia}^{-1}$) foi observada no controlo.

De entre as amostras com água residual, aquela que teve a maior taxa de crescimento específico ($0,249 \text{ dia}^{-1}$) foi a amostra com concentração de água residual de 12,5% e a espécie *L. minor*. O valor mais baixo para a taxa de crescimento específico ($0,178 \text{ dia}^{-1}$) foi obtido também para a *L. minor* e a concentração de água residual de 25%. Os valores das taxas de crescimento específico, em termos do número de frondes, encontram-se na Tabela AIII.6 do Anexo III.

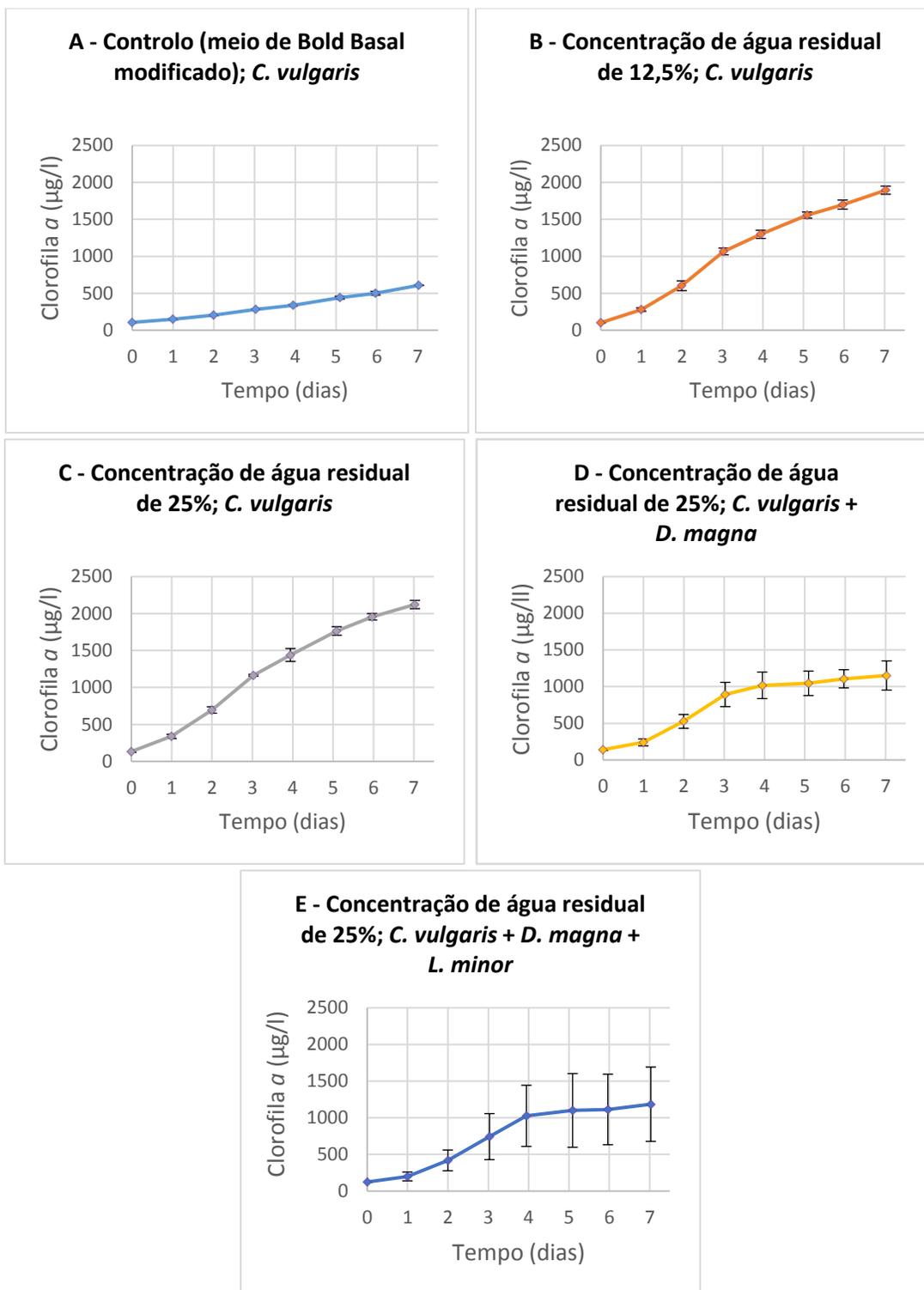


Figura 4.20 - Valores da concentração de clorofila *a* para as amostras com *C. vulgaris* (As barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

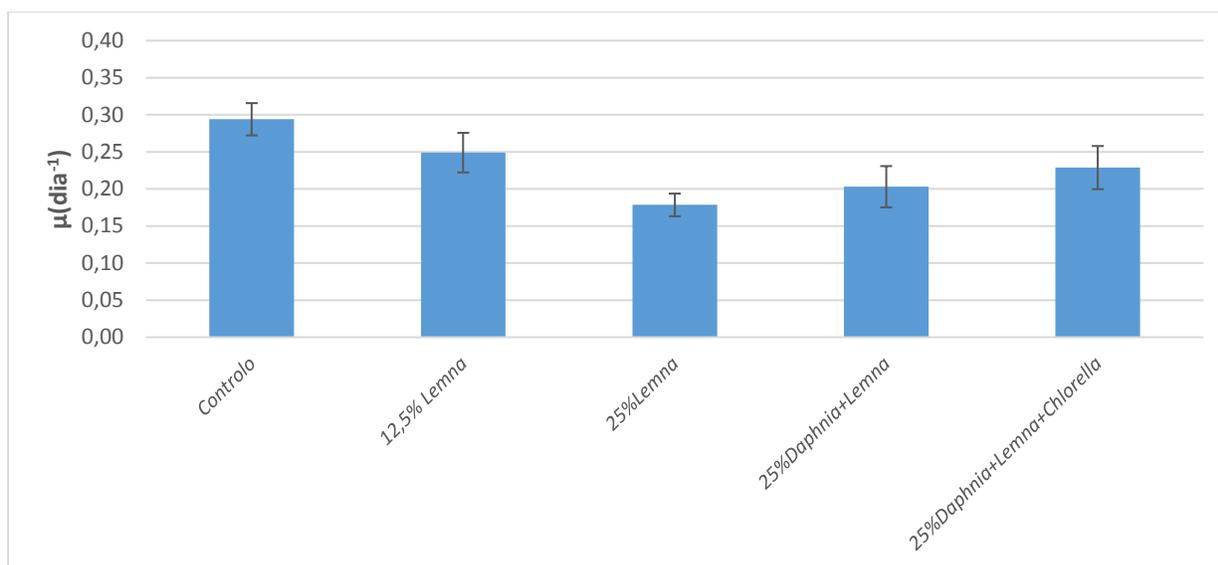


Figura 4.21 - Taxa de crescimento específico para o número de frondes, envolvendo a *L. minor* para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas, entre as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes, realizou-se a análise de variância, ANOVA (fator único). Analisando os valores obtidos (Tabela 4.4), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) é menor que o F (9,67), o que significa que, para um grau de confiança de 95%, existem diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico para cada grupo de amostras.

Tabela 4.4 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com *L. minor*, envolvendo o número de frondes.

| Fonte de variação | SQ | Gl | MQ | F | p | $F_{\text{crítico}}$ |
|-------------------|----------|----|----------|-------------|----------|----------------------|
| Entre grupos | 0,023531 | 4 | 0,005883 | 9,667255253 | 0,001821 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,006085 | 10 | 0,000609 | | | |
| Total | 0,029617 | 14 | | | | |

Foi efetuado o teste de Tukey tendo-se obtido os resultados para o valor de p, apresentados na Tabela AVII.4 do Anexo VII, e a Figura 4.22. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95% para cada um dos vários pares de amostras e observa-se que todos os pares de grupos, com exceção de 25%L-12,5%L, Controlo-25%D+L e Controlo-25%L, não apresentam diferenças significativas em termos estatísticos.

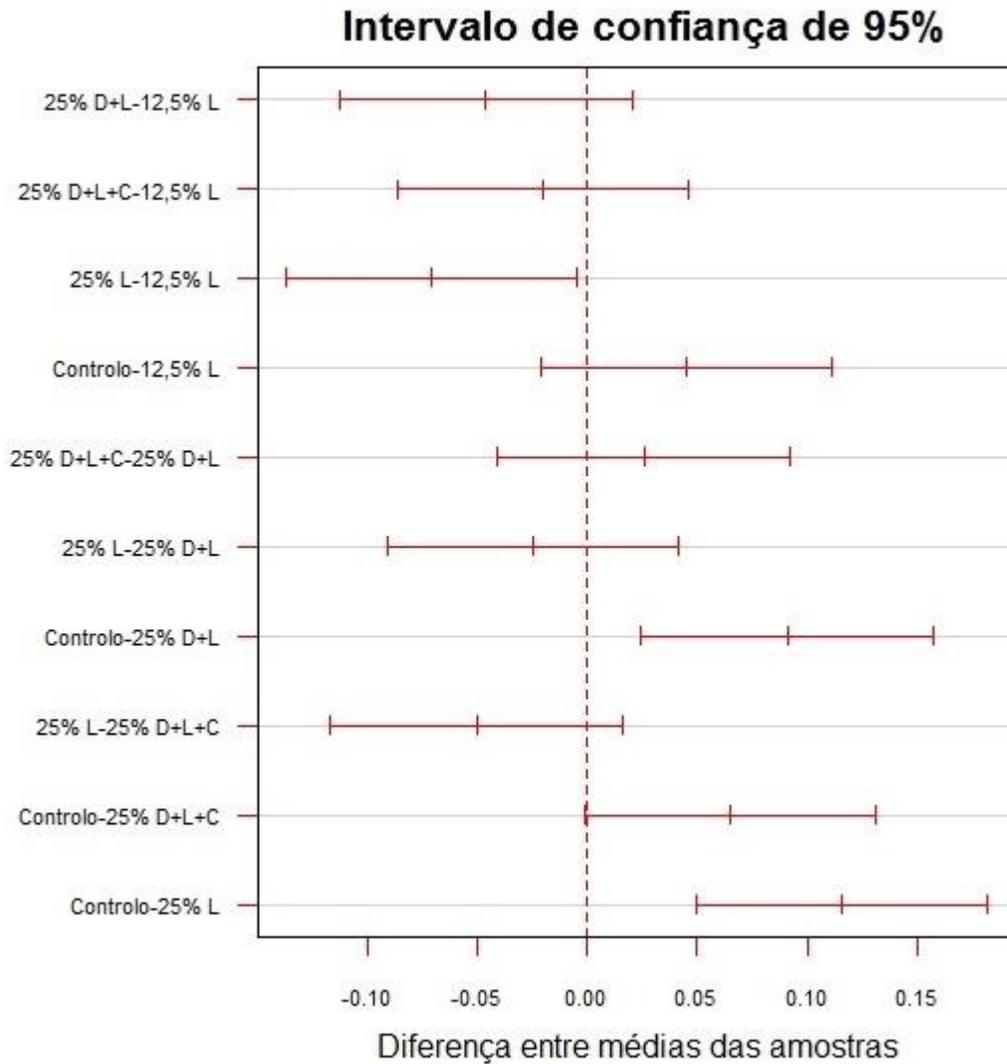


Figura 4.22 - Comparação gráfica entre pares de amostras do intervalo de confiança associado ao teste de Tukey, para as taxas de crescimento específico obtidas para o número de frondes (L-*Lemna* ; D-*Daphnia* ; C-*Chlorella*).

A Figura 4.23, referente ao yield do número de frondes é idêntica à Figura 4.21 da taxa de crescimento específico para o número de frondes. Os valores do yield relativo ao número de frondes, encontram-se na Tabela AIII.5 do Anexo III.

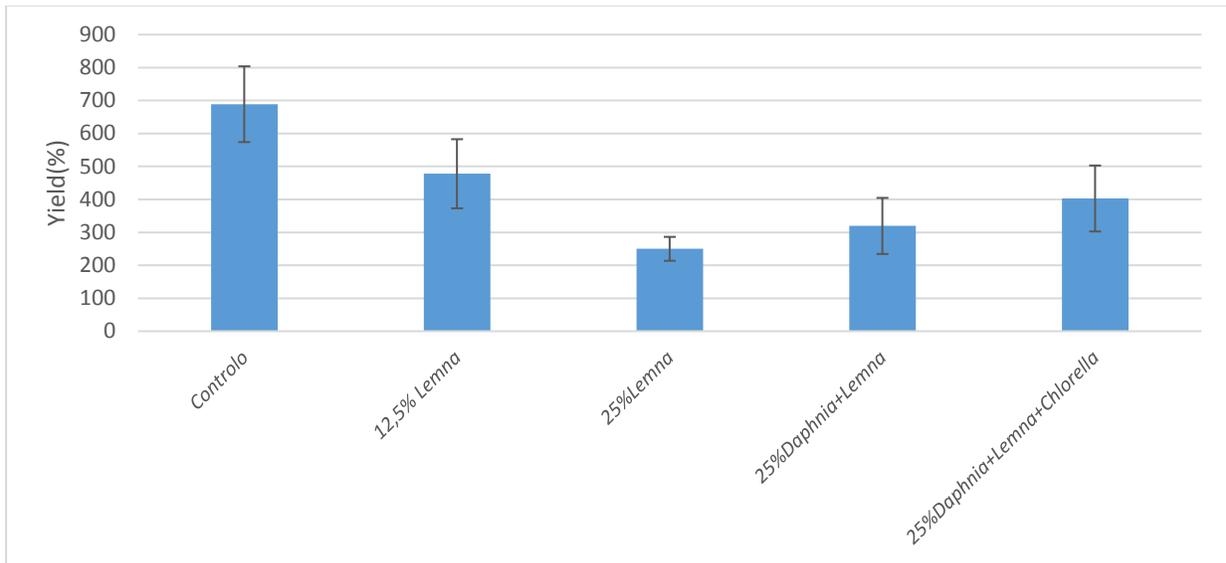


Figura 4.23 - Yield do número de frondes envolvendo a *L. minor*, para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

A taxa de crescimento específico obtida para a área foliar está representada na Figura 4.24. Verifica-se que a mais elevada taxa de crescimento específico é para a amostra de controlo ($\mu = 0,320 \text{ dia}^{-1}$). A maior taxa de crescimento específico para amostras com água residual, ocorreu para o meio de cultura com concentração de água residual de 12,5% e a espécie *L. minor* ($\mu = 0,254 \text{ dia}^{-1}$). O valor mais baixo foi obtido para o meio de cultura com a concentração de água residual de 25% e a espécie *L. minor* ($0,152 \text{ dia}^{-1}$).

Comparando as Figuras 4.21 e 4.24, observa-se que a taxa de crescimento específico para o número de frondes da amostra de 25% *Daphnia+Lemna* é menor que a da amostra de 25% *Daphnia+Lemna+Chlorella*. Já no caso da taxa de crescimento específico para a área foliar, a amostra de 25% *Daphnia+Lemna* tem uma taxa de crescimento específico superior à da amostra de 25% *Daphnia+Lemna+Chlorella*. Embora o número de frondes seja superior na amostra de 25% *Daphnia+Lemna+Chlorella* a área foliar é menor, quando se compara com a amostra 25% *Daphnia+Lemna*. Os valores das taxas de crescimento específico, em termos da área foliar encontram-se na Tabela AIII.6 do Anexo III.

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas entre as taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar, realizou-se a análise de variância, ANOVA (fator único). Analisando os valores obtidos (Tabela 4.5), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) obtido é menor que o F (20,46), pelo que existem, para um grau de confiança de 95%, diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico para cada grupo de amostras.

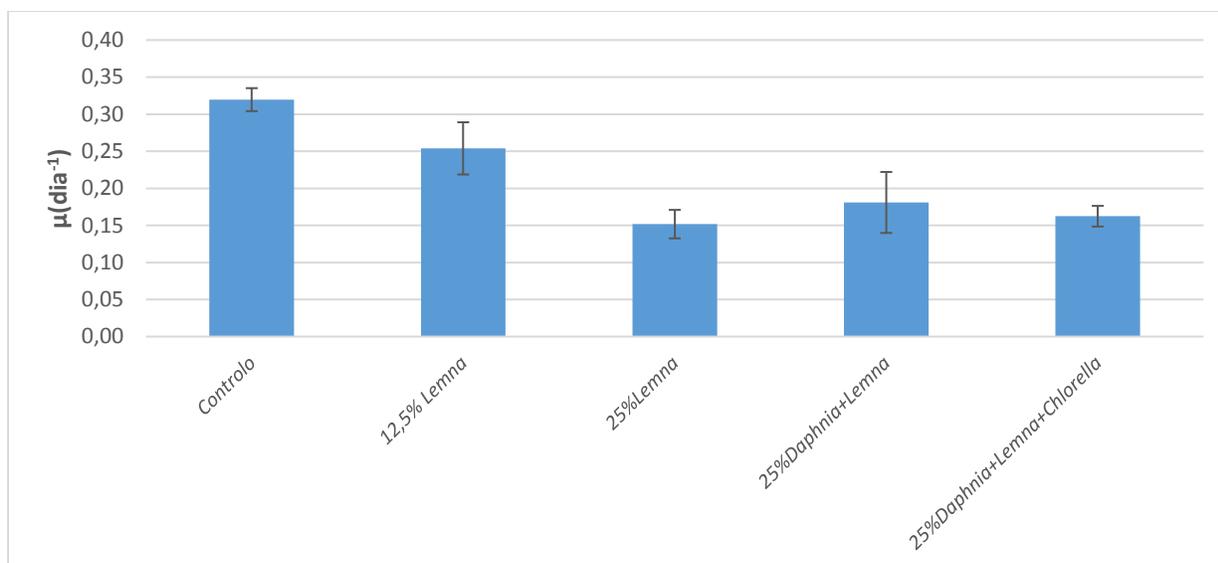


Figura 4.24 - Taxa de crescimento específico da *L. minor* envolvendo a área foliar para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

Tabela 4.5 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com *L.minor*, envolvendo a área foliar.

| Fonte de variação | SQ | GI | MQ | F | p | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|-------------|----------|-----------|
| Entre grupos | 0,061136 | 4 | 0,015284 | 20,45995947 | 8,35E-05 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,00747 | 10 | 0,000747 | | | |
| Total | 0,068606 | 14 | | | | |

Foi efetuado o teste de Tukey, tendo sido obtidos os resultados para o valor de p, apresentados na Tabela AVII.5 do Anexo VII, e a Figura 4.25. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95% para cada um dos vários pares de amostras. De acordo com a figura, observa-se que todos os pares de grupos, com exceção de 25% D+L+C-12,5% L, 25% L-12,5% L, Controlo-25% D+L-, Controlo-25% D+L+C e Controlo-25% L, não apresentam diferenças significativas em termos estatísticos. Comparando estes resultados, relativos às taxas de crescimento específico em termos da área foliar, com os das taxas de crescimento específico em termos do número de frondes (Figura 4.22), verifica-se que existe adicionalmente uma outra amostra com significância estatística (25%D+L+C).

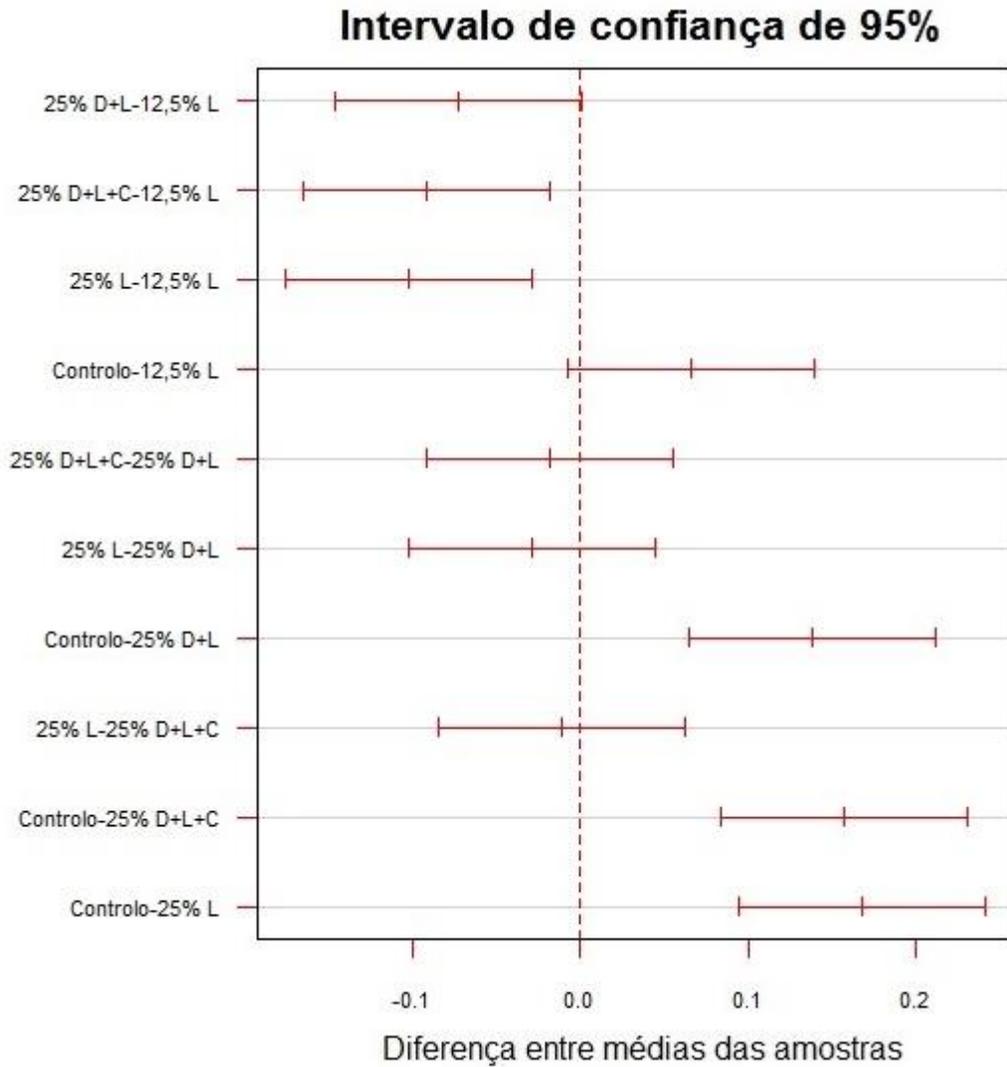


Figura 4.25 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para taxas de crescimento específico obtidas para a área foliar (L-*Lemna* ; D-*Daphnia* ; C-*Chlorella*).

A Figura 4.26 referente ao yield da área foliar é idêntica a Figura 4.24 da taxa de crescimento específico para a área foliar. Os valores do yield da área foliar, encontram-se na Tabela AIII.5 do Anexo III.

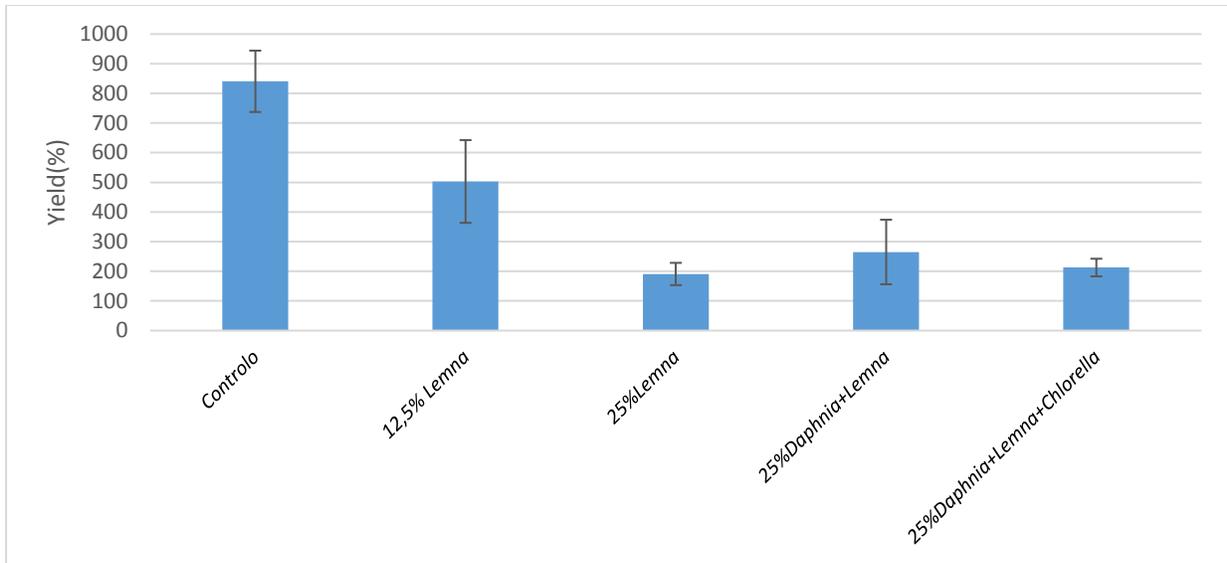


Figura 4.26 - Yield para a área foliar envolvendo a *L. minor* para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

4.3.3.2 *C. vulgaris*

Pode-se observar na Figura 4.27, referente à taxa de crescimento específico para a *C. vulgaris*, que a taxa de crescimento específico mais reduzida foi obtida para a amostra de controlo (0,248 dia⁻¹).

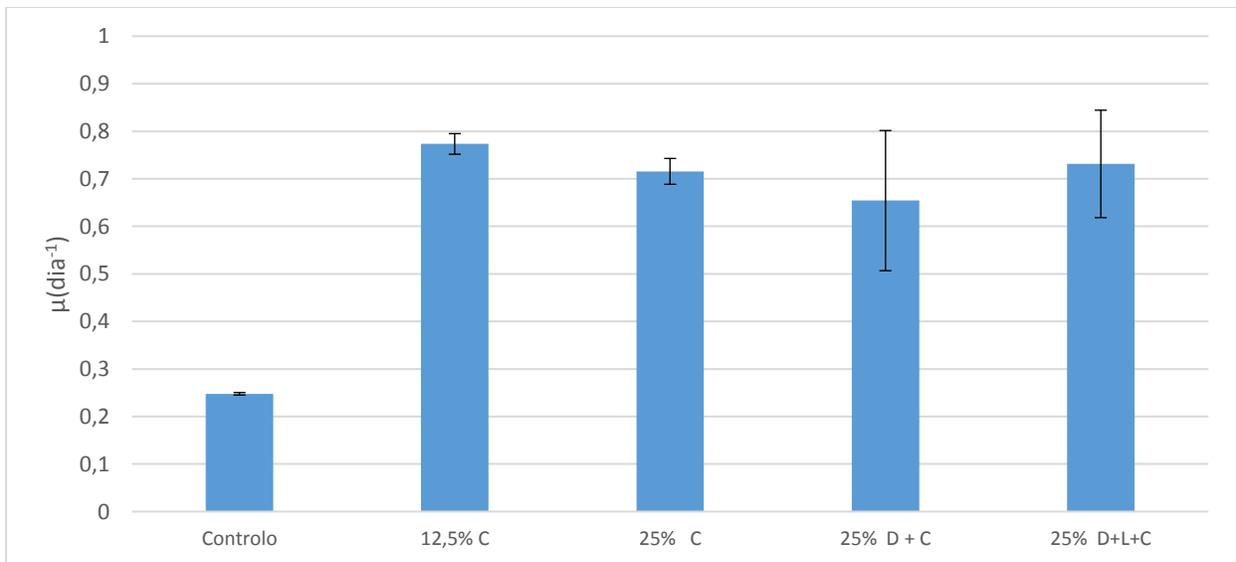


Figura 4.27 - Taxas de crescimento específico envolvendo a *C. vulgaris* para várias concentrações de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

A maior taxa de crescimento específico para amostras com água residual, ocorreu para o meio de cultura com concentração de água residual de 12,5% (0,773 dia⁻¹). O menor valor observado foi obtido para o meio de cultura com a concentração de água residual de 25%, envolvendo ambas as espécies *C. vulgaris* e *D. magna* (0,654 dia⁻¹). Os valores das taxas de crescimento específico para as várias amostras encontram-se na Tabela AII.9 do Anexo II. Os resultados obtidos para as taxas de crescimento específico possuem ordens de grandeza idênticas às indicadas por vários trabalhos envolvendo a *C. vulgaris*, que se situam no intervalo 0,7-2 d⁻¹ (Lakaniemi et al., 2012).

Com o intuito de se averiguar se existem diferenças estatísticas entre as taxas de crescimento específico obtidas para a *C. vulgaris*, realizou-se a análise de variância, ANOVA (fator único). Analisando os valores obtidos (Tabela 4.6), observa-se que o $F_{\text{crítico}}$ (3,48) obtido é menor que o F (19,40), pelo que existem diferenças entre as médias das taxas de crescimento específico para cada grupo de amostras, para um grau de confiança de 95%.

Tabela 4.6 - Resultados da ANOVA, fator único para as amostras do 2º ensaio com *C. vulgaris*.

| Fonte de variação | SQ | GI | MQ | F | p | F crítico |
|-------------------|----------|----|----------|----------|----------|-----------|
| Entre grupos | 0,553555 | 4 | 0,138389 | 19,34083 | 0,000107 | 3,47805 |
| Dentro de grupos | 0,071553 | 10 | 0,007155 | | | |
| Total | 0,625108 | 14 | | | | |

Foi efetuado o teste de Tukey tendo sido obtido os resultados para o valor de p, apresentados na Tabela AVII.6 do Anexo VII, e a Figura 4.28. Esta figura representa os intervalos de confiança de 95% para cada um dos vários pares de amostras. De acordo com a figura, observa-se que os pares de grupos, com exceção do Controlo-12,5% C, Controlo-25% C, Controlo-25% D+C e Controlo-25% D+L+C, não apresentam diferenças significativas em termos estatísticos.

4.3.3.3 *Daphnia*

Na Figura 4.29 observa-se a evolução do número de *D. magna* nas várias amostras com 25% de água residual (25% *Daphnia*, 25% *Daphnia+Chlorella*, 25% *Daphnia+Lemna* e 25% *Daphnia+Lemna+Chlorella*) ao longo dos sete dias do ensaio. O número de *D. magna*, ao longo do ensaio, aumenta no caso das amostras 25% *Daphnia* e 25% *Daphnia+Lemna+Chlorella*. Seria de esperar que o mesmo acontecesse para a amostra 25% *Daphnia+Chlorella*, tendo em consideração que a presença da microalga iria servir como fonte de alimento. Contudo, o processo de transferência desta espécie para os erlenmeyers levou à perda de indivíduos, o que poderá ter afetado os resultados finais do ensaio.

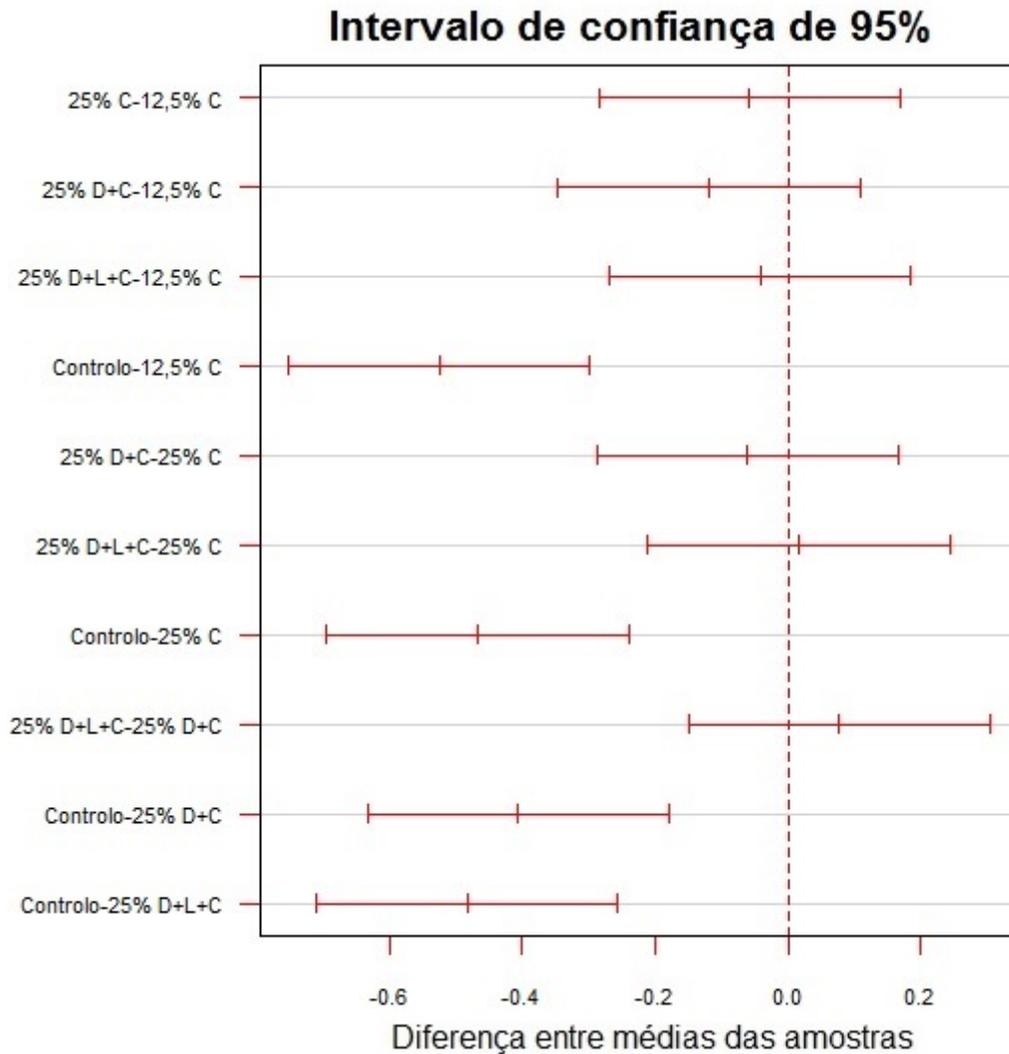


Figura 4.28 - Comparação gráfica entre pares de amostras pelo teste de Tukey para as taxas de crescimento específico obtidas para a *C. vulgaris* (L-*Lemna*; D-*Daphnia*; C-*Chlorella*).

A quantidade de *D. magna* disponível para a realização do ensaio foi limitada, condicionando a escolha de 10 indivíduos com dimensões idênticas para cada amostra. Devido às suas dimensões reduzidas e transparência, houve também alguma dificuldade na sua transferência, o que não permitiu garantir a existência de 10 indivíduos saudáveis em cada amostra. Os valores do número de *D. magna* ao longo do ensaio encontram-se na Tabela AIV.10 do Anexo IV.

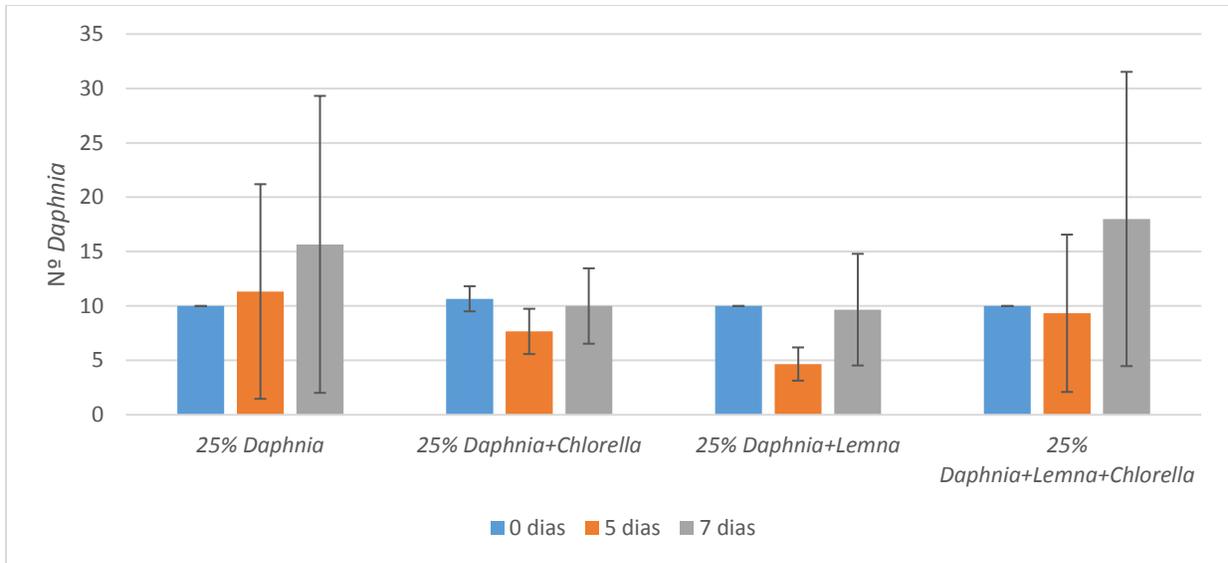


Figura 4.29 - Evolução do número de *D. magna* ao longo do ensaio para concentrações de 25% de água residual (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

A taxa de crescimento específico com o valor mais elevado, ao fim de sete dias, foi obtido para a amostra que contém a *Daphnia*, *Chlorella* e *Lemna*, como se observa na Figura 4.30. Os valores da taxa de crescimento específico de *D. magna*, encontram-se na Tabela AIV.11 do Anexo IV.

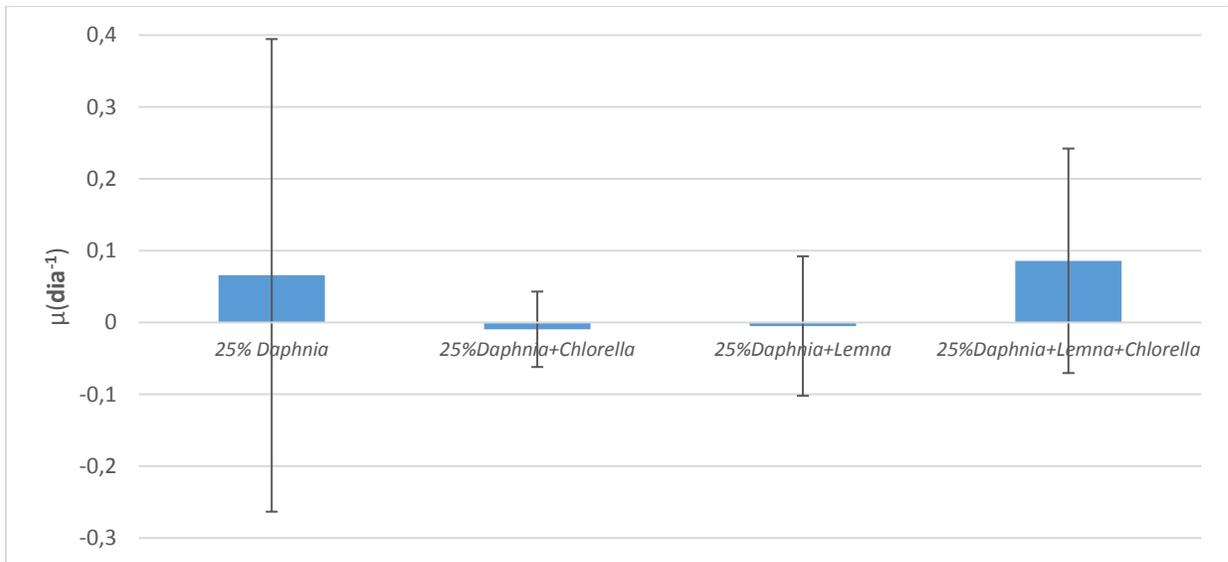


Figura 4.30 - Taxa de crescimento específico da *D. magna* ao fim de 7 dias (as barras verticais representam o desvio padrão dos triplicados das amostras).

4.3.3.4 Amostra com 25% de água residual e as espécies *D. magna*, *L. minor* e *C. vulgaris*

A Figura 4.31 mostra as taxas de crescimento específico das amostras, com concentração de 25% de água residual e envolvendo as espécies *L. minor*, *D. magna* e *C. vulgaris*. Observa-se que, de entre as três espécies, a que teve a taxa de crescimento específico mais elevada foi *C. vulgaris* ($0,632 \text{ dia}^{-1}$). *D. magna* foi a espécie que apresentou a taxa de crescimento específico mais reduzida ($0,086 \text{ dia}^{-1}$). Os valores referentes à Figura 4.31 para as espécies *L. minor*, *D. magna* e *C. vulgaris*, encontram-se nas Tabelas AIII.6, AIV.11 e AII.9 dos Anexos III, IV e II respetivamente.

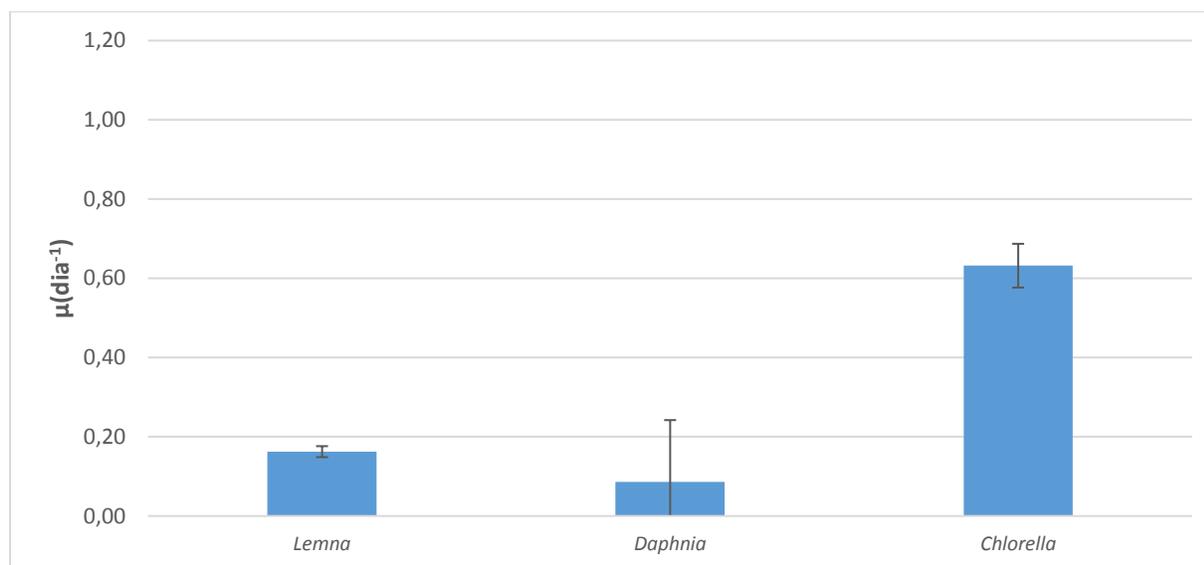


Figura 4.31 - Taxas de crescimento específico para a amostra com a concentração de 25% de água residual para as espécies *L. minor*, *D. magna* e *C. vulgaris*.

4.4 Concentração de fósforo total e azoto total das amostras no final dos ensaios e respetivas eficiências de remoção

4.4.1 Concentração de fósforo total e azoto total no 1º Ensaio

Na Tabela 4.7 encontram-se os valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 1º ensaio. Analisando a Tabela 4.7, observa-se que a concentração de fósforo total, para as amostras com as várias diluições de água residual é menor para as amostras com *L. minor*, quando comparado com as amostras com *C. vulgaris*, concluindo-se que para as várias diluições de água residual há uma remoção mais elevada de fósforo total por parte da *L. minor*.

Tabela 4.7 - Valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 1º ensaio, para várias concentrações de água residual.

| | P total (mg P/l) | N total (mg N l) |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| Controlo <i>Lemna</i> | 0,11 | 12,61 |
| 25% <i>Lemna</i> | 0,06 | 5,60 |
| 50% <i>Lemna</i> | 0,13 | 6,72 |
| 75% <i>Lemna</i> | 0,15 | 6,72 |
| 100% <i>Lemna</i> | 0,06 | 13,45 |
| Controlo <i>Chlorella</i> | 0,37 | 7,29 |
| 25% <i>Chlorella</i> | 0,42 | 7,29 |
| 50% <i>Chlorella</i> | 0,26 | 5,60 |
| 75% <i>Chlorella</i> | 0,20 | 7,85 |
| 100% <i>Chlorella</i> | 0,13 | 9,53 |

4.4.2 Eficiências de remoção de fósforo total e azoto total no 1º Ensaio

Embora não se tenha realizado a determinação da concentração inicial de nutrientes nas amostras utilizadas no 1º ensaio, é possível estimar, de uma forma aproximada, a sua taxa de remoção para a amostra que contém uma concentração de 100% de água residual. Nesse sentido usou-se a caracterização inicial da água residual tratada fornecida pela SIMARSUL (2019) na obtenção de um valor aproximado da taxa de remoção do fósforo total e azoto total.

As amostras compostas por 100% de água residual com *L. minor* e *C. vulgaris*, têm as eficiências de remoção de fósforo e azoto que se encontram na Tabela 4.8. No caso de *L. minor* foi removido cerca de 98% de fósforo e de 73% de azoto, e para a *C. vulgaris* foi removido cerca de 97% de fósforo e de 81% de azoto.

No trabalho de Özengin & Elmaci (2007), foi avaliado o uso de *L. minor* para remoção de fósforo e azoto de uma água residual doméstica, tendo sido obtidas eficiências de remoção de fósforo e azoto de 86,49% e de 71,72%, respetivamente. Estas eficiências encontram-se dentro da ordem de grandeza dos valores obtidos (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Eficiências de remoção para a *L. minor* e *C. vulgaris* em 100% de água residual.

| | P | N |
|---|----|----|
| Eficiência de remoção (%), para a <i>L. minor</i> | 98 | 73 |
| Eficiência de remoção (%), para a <i>C. vulgaris</i> | 97 | 81 |

4.4.3 Concentração de fósforo total e azoto total no 2º Ensaio

Na Tabela 4.9 encontram-se os valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 2º ensaio para concentrações de 12,5% e 25% de água residual. Observa-se que as amostras só com *L. minor* são as que demonstram maior eficiência na remoção de fósforo e azoto. O valor mínimo da concentração de fósforo (0,02 mg/l) é obtido para amostras com *L. minor* e uma concentração de 25% de água residual, enquanto que a concentração mínima de azoto (1,12 mg/l) corresponde a uma amostra de *L. minor* e concentração de 12,5% de água residual.

Tabela 4.9 - Valores obtidos para as concentrações de fósforo total e azoto total no final do 2º ensaio.

| | P total (mg P /l) | N total (mg N /l) |
|--|----------------------|----------------------|
| Controlo <i>Chlorella</i> | 0,41 | 12,61 |
| 12,5% <i>Chlorella</i> | 0,70 | 1,68 |
| 25% <i>Chlorella</i> | 0,37 | 2,24 |
| Controlo <i>Lemna</i> | 0,69 | 1,12 |
| 12,5% <i>Lemna</i> | 0,03 | 1,12 |
| 25% <i>Lemna</i> | 0,02 | 1,68 |
| 25% <i>Daphnia</i> | 0,07 | 8,41 |
| 25% <i>Daphnia</i> + <i>Chlorella</i> | 0,06 | 2,80 |
| 25% <i>Daphnia</i> + <i>Lemna</i> | 0,32 | 3,36 |
| 25% <i>Daphnia</i> + <i>Lemna</i> + <i>Chlorella</i> | 0,33 | 3,36 |

4.4.4 Eficiências de remoção de fósforo total e azoto total no 2º Ensaio

No 2º ensaio, por lapso, não foram efetuadas as determinações das concentrações iniciais de fósforo total e azoto total e, como nenhuma das amostras possuía uma concentração de 100% de água residual, não foi possível fazer uma estimativa da sua taxa de remoção. Com efeito, se se tivesse determinado a concentração de fósforo e azoto no final do ensaio para amostras com uma concentração de 100% de água residual, teria sido possível estimar a remoção de azoto e fósforo através dos dados da caracterização inicial da água residual, fornecidos pela SIMARSUL (2019).

4.5 Discussão integrada dos resultados

Na Figura 4.32 encontram-se as taxas de crescimento específico da *C. vulgaris* e *L. minor* (em termos do número de frondes) no 1º ensaio, para várias concentrações de água residual.

Quando se compara a evolução das taxas de crescimento específico, em termos do aumento da concentração da água residual nas amostras, observa-se uma evolução oposta para as duas espécies. A

taxa de crescimento específico de *C. vulgaris* aumenta com o aumento da concentração da água residual, enquanto que no caso da *L. minor*, em termos do número de frondes, o que se verifica, também, para a área foliar, a taxa de crescimento específico diminui. Pode-se assim concluir que a água residual utilizada é adequada para o crescimento da *C. vulgaris* e tóxica para a *L. minor*. Embora usando água residual diferente, os resultados obtidos para a *L. minor* estão de acordo com os referidos no trabalho de Žaltauskaitė et al. (2014), em que a água residual tratada inibiu o crescimento da *L. minor*. Foi também reportado que morreram as plantas expostas a concentrações mais elevadas de água residual tratada (50-100%). No trabalho de Onay (2018), os resultados foram diferentes dos obtidos para as taxas de crescimento específico de *C. vulgaris*, o que poderá ser justificado, pelas condições experimentais e água residual não serem as mesmas. Com efeito, a intensidade luminosa indicada foi aproximadamente o dobro da utilizada no âmbito desta tese e a água residual utilizada, era proveniente da cidade de Van na Turquia, tendo sido autoclavada e diluída com o meio de cultura Bold Basal modificado.

Na Figura 4.33 encontram-se as taxas de crescimento específico da *C. vulgaris* e *L. minor* (em termos do número de frondes) no 2º ensaio, para as amostras de controlo, 12,5% e 25% de água residual. Verifica-se, como anteriormente, que a taxa de crescimento específico das amostras com a espécie *L. minor*, diminui com o aumento da concentração da água residual.

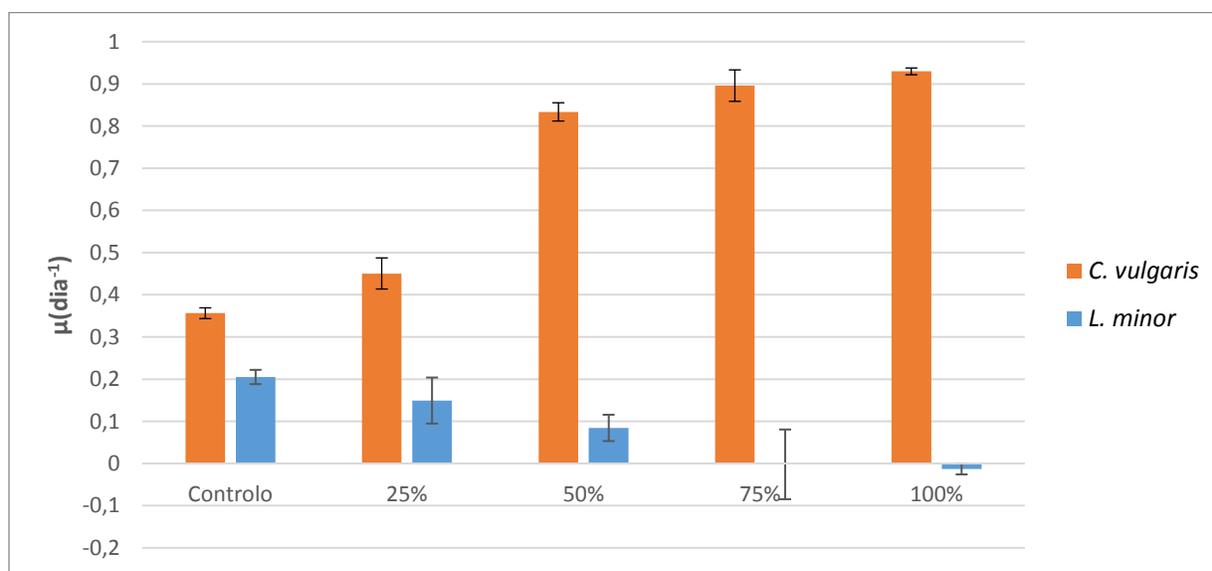


Figura 4.32 - Taxas de crescimento específico de *C. vulgaris* e *L. minor* (em termos do número de frondes) no 1º ensaio para várias concentrações de água residual.

Já para a *C. vulgaris* há um aumento da taxa de crescimento específico, com o aumento da concentração de água residual até 12,5%, seguida de uma ligeira descida, quando a concentração de água residual sobe para 25%, embora pouco significativa. Não foi apresentada a figura das taxas de crescimento específico de *C. vulgaris* e da *L. minor* (em termos da área foliar) no 2º ensaio por ser idêntica à Figura 4.33.

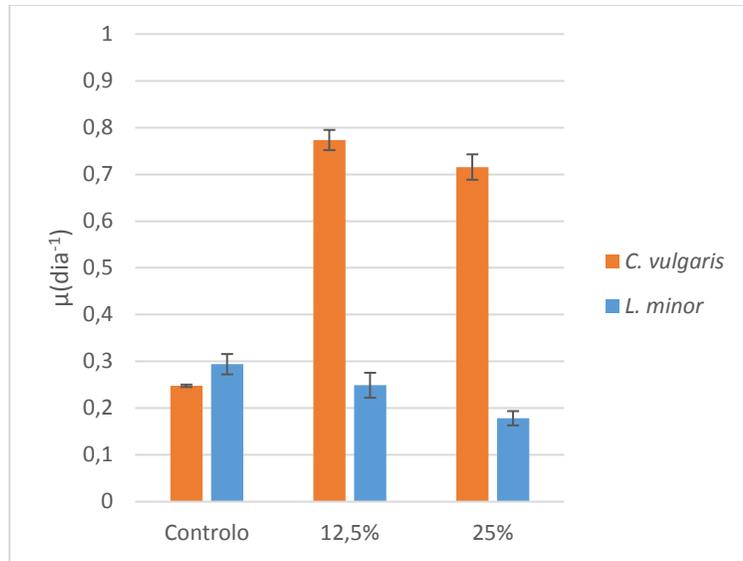


Figura 4.33 - Taxas de crescimento específico da *C. vulgaris* e *L. minor* (em termos do número de frondes) no 2º ensaio, para as amostras de controlo e concentrações de 12,5% e 25% de água residual.

Na Figura 4.34 observa-se, para a amostra de controlo, a taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *C. vulgaris*. No 2º ensaio a taxa de crescimento específico foi inferior, o que poderá ser explicado em termos das diferentes condições experimentais, entre os dois ensaios. Nomeadamente, o valor da temperatura para o 1º e 2º ensaio foi aproximadamente 24 °C e 21 °C, respetivamente. Os resultados obtidos para a taxa de crescimento estão de acordo como as conclusões de Singh & Singh (2015), que indicaram que 25 °C seria a temperatura ótima para o crescimento de microalgas do género *Chlorella*.

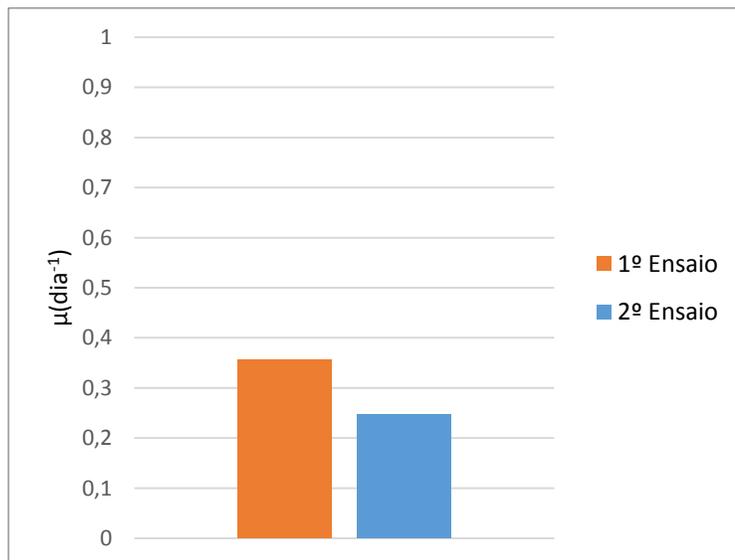


Figura 4.34 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *C. vulgaris* nas amostras de controlo.

Na Figura 4.35 observam-se as taxas de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *C. vulgaris* na amostra com a concentração de 25% de água residual. No 2º ensaio, a taxa de crescimento específico foi superior, o que poderá ser explicado em termos das diferenças de temperatura para os dois ensaios e ao facto de se ter utilizado uma água residual com características diferentes, como se pode observar na tabela AVI.1 do Anexo VI. No 1º e 2º ensaio, os valores de concentração de fósforo e azoto na água residual foram 8,7 mg P/l, 44 mg N/l e 1,8 mg P/l, 17 mg N/l, respetivamente. Por sua vez o valor do rácio N:P para o 1º e 2º ensaio foram 11 e 21, respetivamente.

Nas Figuras 4.36 e 4.37, observam-se as taxas de crescimento específico no 1º e 2º ensaio, para a *L. minor* em termos da área foliar e do número de frondes, para as amostras com a concentração de 25% de água residual. Embora as condições experimentais e água residual utilizada no 1º e 2º ensaio não sejam exatamente as mesmas, pode-se observar na Figura 4.36, que a taxas de crescimento específico, relativas à área foliar, são idênticas, o que não acontece para a taxas de crescimento específico em termos do número de frondes.

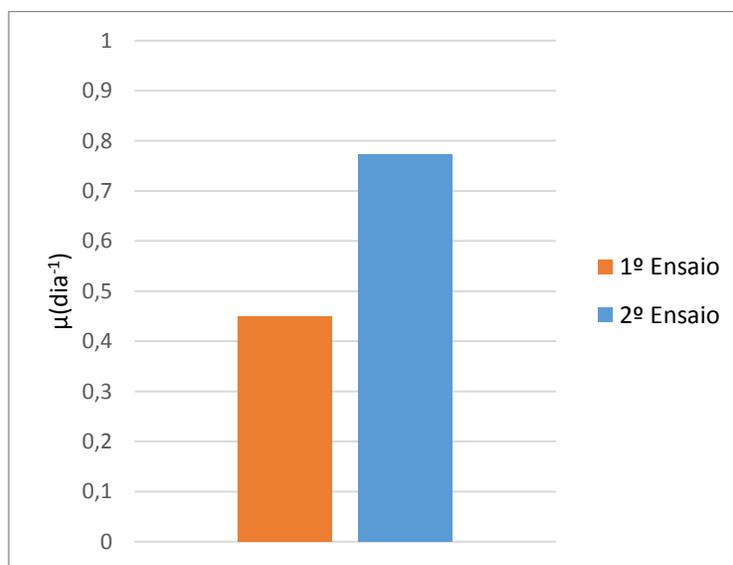


Figura 4.35 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *C. vulgaris* nas amostras com a concentração de 25% de água residual.

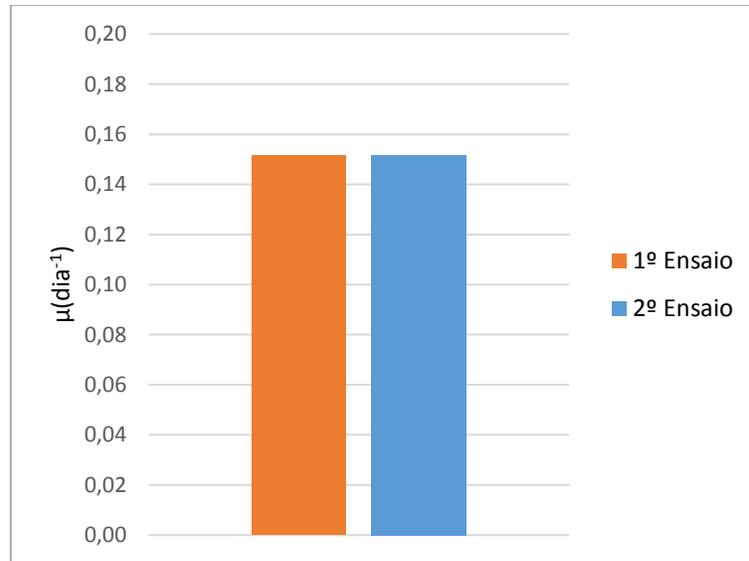


Figura 4.36 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *L. minor* em termos da área foliar, nas amostras com a concentração de 25% de água residual.

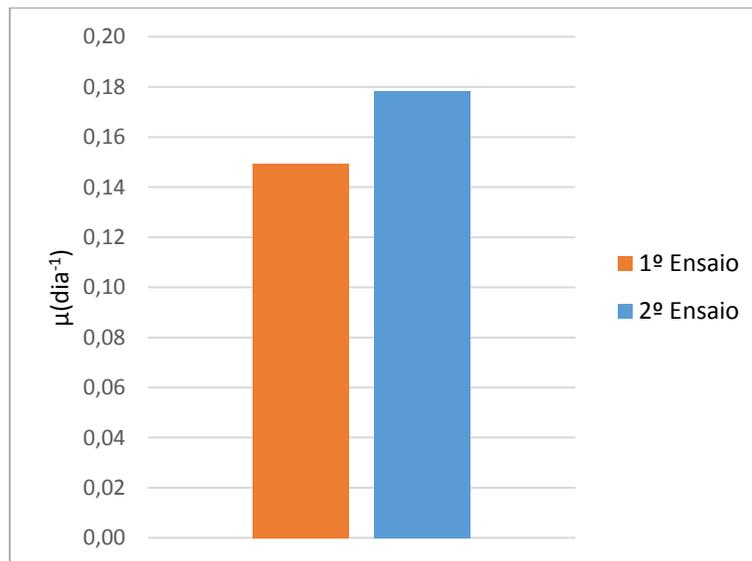


Figura 4.37 - Taxa de crescimento específico no 1º e 2º ensaio para a *L. minor* em termos do número de frondes, nas amostras com a concentração de 25% de água residual.

Comparando a amostra só com *C. vulgaris* com as amostras com *C. vulgaris* e *D. magna* e *D. magna*, *L. minor* e *C. vulgaris*, para a concentração de água residual de 25% (Figura 4.27), observa-se que a *D. magna* não afetou significativamente as taxas de crescimento específico de *C. vulgaris*. Tendo em consideração que, a presença da *Daphnia magna* pode afetar o crescimento das microalgas (Long et al., 2007; Lass & Spaak 2003), seria espetável que para as amostras, com a concentração de 25% de água residual, de *Daphnia+Chlorella* e *Daphnia+Lemna+Chlorella*, a taxa de crescimento específico da *Chlorella vulgaris* (Figura 4.27) fosse menor, quando comparada com a amostra só com esta espécie (25% de água residual com *C. vulgaris*). Para a taxa de crescimento específico da *L. minor*, em termos do número de frondes (Figura 4.21) e da área foliar (Figura 4.24), comparando as amostras, com a concentração de 25% de água residual, de *Lemna*, *Daphnia+Lemna* e *Daphnia+Lemna+Chlorella*, observa-se que nas amostras onde a *D. magna* se encontra presente, a taxa de crescimento específico foi mais alta do que na amostra, só com *Lemna*. Na preparação do 2º ensaio laboratorial, foi difícil garantir que as amostras com *D. magna* tivessem 10 indivíduos idênticos e saudáveis, o que poderá explicar os resultados obtidos.

5. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

No âmbito deste trabalho, analisou-se o crescimento de duas espécies de produtores primários, a planta *Lemna minor* e a microalga *Chlorella vulgaris*, numa água residual proveniente da ETAR da Quinta do Conde. Para além das espécies mencionadas utilizou-se, também, um microcrustáceo herbívoro *Daphnia magna*, com o objetivo de avaliar a sua interação com *L. minor* e *C. vulgaris*.

A seleção da ETAR foi efetuada, com base num sistema de classificação, desenvolvido durante este estudo. A escolha da ETAR recaiu na ETAR da Quinta do Conde, que possui um efluente com as características mais apropriadas para a realização dos ensaios laboratoriais. A metodologia desenvolvida poderá ser muito útil para estudos posteriores.

Para além de um ensaio preliminar, foram realizados dois ensaios, durante um período de sete dias e em condições pré-estabelecidas de temperatura e iluminação. No 1º ensaio determinaram-se as taxas de crescimento específico de *L. minor* e *C. vulgaris*, em amostras com concentrações de água residual de 25%, 50%, 75% e 100%. No 2º ensaio, além das espécies *L. minor* e *C. vulgaris*, também, se utilizou a espécie *D. magna*. Neste ensaio, determinou-se a taxa de crescimento específico de *L. minor* e *C. vulgaris*, em amostras com concentrações de água residual de 12,5% e 25% e avaliou-se a interação entre *D. magna*, *L. minor* e *C. vulgaris*, para uma concentração de água residual de 25%. Durante os ensaios foi medido o pH de todas as amostras.

No final do 1º ensaio verificou-se que, para *L. minor*, relativamente ao número de frondes e área foliar, a mais elevada taxa de crescimento específico foi para a amostra de controlo, com valores de 0,205 dia⁻¹ e 0,159 dia⁻¹, respetivamente, e um pH de 5,4. Com o aumento da concentração de água residual, houve uma diminuição das taxas de crescimento específico. Com água residual, a taxa de crescimento específico mais elevada ocorreu para o meio de cultura com menor concentração de água residual, 25%, com pH de 9,5, sendo a taxa de crescimento específico de 0,149 dia⁻¹, para o número de frondes e de 0,151 dia⁻¹, para a área foliar. O menor valor observado para a taxa de crescimento específico, relativamente, ao número de frondes e área foliar, foi de -0,013 dia⁻¹ e de -0,004 dia⁻¹, respetivamente, obtido para o meio de cultura, com a maior concentração de água residual, 100%, e um pH de 9,6.

Relativamente a *C. vulgaris*, de entre as taxas de crescimento específico na fase exponencial para as várias amostras, no 1º ensaio, a que teve o valor mais baixo foi a amostra de controlo, 0,364 dia⁻¹, e um pH de 7,2. Para esta espécie, verificou-se um aumento da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração da água residual. Assim, para a amostra com 100% de água residual, obteve-se o valor mais elevado da taxa de crescimento específico, 0,930 dia⁻¹, e um pH de 10,6.

No 1º ensaio, utilizando a caracterização inicial da água residual tratada, fornecida pela SIMARSUL 2019, foi possível a obtenção de um valor aproximado das eficiências de remoção de azoto e fósforo para *L. minor* e *C. vulgaris*. No caso da *L. minor* foi removido 73% de azoto e 98% de fósforo, e para a *C. vulgaris* foi removido 81% de azoto e 97% de fósforo.

Os resultados anteriores permitem concluir que a *C. vulgaris* se adaptou melhor ao meio com água residual e possui uma maior eficiência de remoção de azoto que a *L. minor*. Contudo, a *L. minor* é mais eficiente na remoção de fósforo. Estes resultados evidenciam algumas das vantagens da utilização destes organismos, relativamente à avaliação físico-química, pois permitem não só remover elementos nocivos como dão uma indicação mais correta do efeito que a água residual irá ter no ecossistema.

No final do 2º ensaio, a *L. minor* continua a ter a mais elevada taxa de crescimento específico, relativamente ao número de frondes e área foliar, para a amostra de controlo, 0,294 dia⁻¹ e 0,320 dia⁻¹ respetivamente, sendo o pH de 8,3. De entre as amostras com água residual, aquelas que tiveram a maior taxa de crescimento específico foram as amostras com concentração de água residual de 25%, com 0,249 dia⁻¹, para o número de frondes e 0,254 dia⁻¹, para a área foliar, sendo o pH de 9,8. Os valores mais baixos obtidos para a taxa de crescimento específico foram de 0,178 dia⁻¹, para o número de frondes e de 0,152 dia⁻¹, para a área foliar para as amostras com uma concentração de água residual de 12,5%, com o pH de 8,8.

Relativamente ao 2º ensaio para *C. vulgaris*, a taxa de crescimento específico mais baixa foi registada para a amostra de controlo, 0,249 dia⁻¹, com pH de 7,7. A maior taxa de crescimento específico, para amostras com água residual, ocorreu para o meio de cultura com concentração de água residual de 12,5%, 0,661 dia⁻¹, com pH de 9,7. O meio de cultura, com a concentração de água residual de 25% teve uma taxa de crescimento específico de 0,610 dia⁻¹, e um pH de 10,1.

Estes resultados, ao serem comparados com os do 1º ensaio, permitem evidenciar as alterações nas características da água residual, que poderão estar na origem das diferenças observadas nas taxas de crescimento específico. Uma monitorização regular da água residual será, pois essencial.

Foi investigado o efeito da introdução da *D. magna*, para uma concentração de água residual de 25%, nas taxas de crescimento específico da *C. vulgaris* e da *L. minor*. Quando se compara a amostra só com *C. vulgaris*, com as amostras com *C. vulgaris*+*D. magna* e *D. magna*+*L. minor* +*C. vulgaris*, observa-se que a *D. magna*, não levou a diferenças significativas entre as taxas de crescimento específico das amostras. Para o caso da taxa de crescimento específico da *L. minor*, em termos do número de frondes e da área foliar, quando foram comparadas as amostras de *L. minor*, *D. magna*+*L. minor* e *D. magna*+ *L. minor* +*C. vulgaris*, observou-se que nas amostras onde a *D. magna* se encontra presente, a taxa de crescimento específico foi mais alta, do que na amostra só com *L. minor*. Por sua vez, a taxa de crescimento específico para o número de frondes da amostra com *D. magna*+*L. minor*, é menor que a da amostra com *D. magna*+ *L. minor* +*C. vulgaris*. Já no caso da taxa de crescimento específico para a área foliar, a amostra *D. magna*+*L. minor* tem uma taxa de crescimento específico superior à da amostra *D. magna*+ *L. minor* +*C. vulgaris*.

A taxa de crescimento específico mais elevada para a *D. magna* foi a da amostra que contém a *C. vulgaris* + *L. minor*, com o valor de 0,086 dia⁻¹, para um valor de pH de 10,1. A que teve o valor mais baixo para a taxa de crescimento específico foi para a amostra com *C. vulgaris*, -0,009 dia⁻¹, com o valor de pH de 9,8.

Os resultados anteriores permitem evidenciar a necessidade de mais estudos envolvendo a espécie *D. magna*, em conjunto com a *L. minor* e a *C. vulgaris*, quer utilizando outras concentrações de água residual ou aperfeiçoando as técnicas de caracterização experimental.

No seguimento do trabalho desenvolvido no âmbito desta tese há diversos aspetos que poderão ser explorados de forma a complementar e melhorar os estudos realizados. Alguns dos trabalhos futuros propostos são:

1. Estudar a eficiência de remoção de nutrientes no efluente tratado da ETAR da Quinta do Conde, tendo em consideração que os ensaios realizados com *C. vulgaris* apresentaram um crescimento significativo desta microalga, para uma concentração de 100% de efluente tratado.

2. Averiguar a viabilidade da produção de biomassa algal, através de um sistema piloto, testando a viabilidade da sua aplicação no campo.
3. Determinar as eficiências de remoção de nutrientes em amostras com as espécies *D. magna*, *L. minor* e *C. vulgaris* e avaliar como a interação entre elas afeta as taxas de remoção.
4. Validar o sistema de classificação desenvolvido para a escolha da ETAR, que deverá possuir o efluente com as características mais apropriadas ao crescimento de uma das espécies (*C. vulgaris* ou *L. minor*).

6. Referências bibliográficas

- Abinandan, S., Bhattacharya, R., & Shanthakumar, S. (2015). Efficacy of *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus abundans* for Nutrient Removal in Rice Mill Effluent (Paddy Soaked Water). *International Journal of Phytoremediation*, 17(1-6), 377–381. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.910167>
- Abou-Shanab, R. A., Ji, M. K., Kim, H. C., Paeng, K. J., & Jeon, B. H. (2013). Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *Journal of Environmental Management*, 115, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
- Ahlenius, H., & UNEP/GRID-Arendal (2010). *Ratio of wastewater treatment*. Acedido em 20 de Setembro 2019. Disponível em <https://www.grida.no/resources/7599>
- Alaerts, G. J., Mahbubar, M. D. R., & Kelderman, P. (1996). Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon. *Water Research*, 30(4), 843 - 852. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00234-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00234-0)
- Ale, M. T., Pinelo, M., & Meyer, A. S. (2014). Assessing Effects and interactions among key variables affecting the growth of mixotrophic microalgae: pH, inoculum volume, and growth medium composition. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44(3), 242–256. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.812562>
- Al-Gheethi, A. A., Mohamed, R. M., Jais, N. M., Efaq, A. N., Halid, A. A., Wurochekke, A. A., & Amir-Hashim, M. K. (2017). Influence of pathogenic bacterial activity on growth of *Scenedesmus* sp. and removal of nutrients from public market wastewater. *Journal of Water & Health*, 15(5), 741–756. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.080>
- Almeida, A. (2018). Avaliação do potencial de *Lemna minor* como bioindicador de toxicidade em águas residuais (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.
- Al-Nozaily, F., Alaerts G. J., & Veenstra S. (2000). Performance of duckweed-covered sewage lagoons II. Nitrogen and phosphorus balance and plant productivity. *Water Research*, 34(10), 2734–2741. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00004-X)
- Alva-Martínez, A. F., Sarma, S. S. S. & Nandini, S. (2001). Comparative population dynamics of three cladoceran species (Cladocera) in relation to different levels of *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*. *Crustaceana*, 74, 749-764. www.jstor.org/stable/20105310
- Alyabyev, A. J., Loseva, N. L., Gordon, L. K., Andreyeva, I. N., Rachimova, G. G., Tribunskih, V. I., Kemp, R. B. (2007). The effect of changes in salinity on the energy yielding processes of *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima* cells. *Thermochimica Acta*, 458(1–2), 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.03.003>
- Ansa, E. D. O., Lubberding, H. J., Ampofo, J. A., & Gijzen, H. J. (2012). Attachment of faecal coliform and macro-invertebrate activity in the removal of faecal coliform in domestic wastewater treatment pond systems. *Ecological Engineering*, 42(1), 35-41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.01.018>
- Ansari, A. A., & Khan, F.A. (2008). Remediation of eutrophic water using *Lemna minor* in a controlled environment. *African Journal of Aquatic Science*, 33(3), 275–278.

<https://doi.org/10.2989/AJAS.2008.33.3.11.623>

APA (2007). *Relatório de conformidade ambiental do projecto de execução da estação de tratamento de águas residuais do Seixal*. Amadora: APA. Disponível em : http://siaia.apambiente.pt/AIADOC/RECAPE174/etar%20do%20seixal_sum%C3%A1rio%20executivo20181122141432.pdf

APA (2020). *Diretiva das Águas Residuais Urbanas*. Amadora: APA. Acedido em 27 fevereiro, 2020. <http://apambiente.pt/index.php?ref=16&subref=7&sub2ref=818&sub3ref=1245>

Appenroth, K. J., Borisjuk, N., & Lam, E. (2013). Telling duckweed apart: Genotyping technologies for the Lemnaceae. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1145.2013.00001>

Appenroth, K. J., Ziegler, P., & Sree, K.S. (2016). Duckweed as a model organism for investigating plant-microbe interactions in an aquatic environment and its applications. *Endocytobiosis and Cell Research*, 27, 94-106. https://zs.thulb.uni-jena.de/receive/jportal_jparticle_00453025;

Araújo, R. S., da Gloria Alves, M., Condesso de Melo, M. T., Chrispim, Z. M., Mendes, M. P., & Silva Júnior, G. C. (2015). Water resource management: a comparative evaluation of Brazil, Rio de Janeiro, the European Union, and Portugal. *The Science of the Total Environment*, 511, 815–828. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.098>

Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., & Perales, J. A. (2014). Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research*, 49, 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.036>

Atiku, H., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A. A., Wurochekke, A. A., & Kassim, A. H. M. (2016). Harvesting of microalgae biomass from the phycoremediation process of greywater. *Environ. Sci. Poll. Res.*, 23(24), 24624–24641. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7456-9>

Azov, Y., & Shelef, G. (1987). The effect of pH on the performance of the high-rate oxidation ponds. *Water Sci. Technol.*, 19 (12), 381– 383. <https://doi.org/10.2166/wst.1987.0177>

Barghbani, R., Rezaei, K., & Javanshir, A. (2012). Investigating the effects of several parameters on the growth of *Chlorella vulgaris* using Taguchi's experimental approach. *Int. J. Biotech. Wellness Ind.*, 1(2), 128-133. <http://www.lifescienceglobal.com/pms/index.php/ijbwi/article/view/28>

Barra, L., Chandrasekaran, R., Corato, F., & Brunet, C. (2014). The Challenge of Ecophysiological Biodiversity for Biotechnological Applications of Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 12, 1641-75. <http://www.doi.org/10.3390/md12031641>

Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/S0014479700025126>

Benedetti, L. (2006). *Probabilistic design and upgrade of wastewater treatment plants in the EU Water Framework Directive Context* (Tese de Doutoramento, pp.304). Universidade de Ghent, Bélgica.

Berg, H., Jeude, E., Hak, A., Mooren, C., Uijl, R., Giomi, T., & Kraaijeveld, S. (2015). *Duckweed, a tiny aquatic plant with growing potential – A research on the potential applications of duckweed in urban water systems in the Netherlands*. Universidade de Utrecht, Países Baixos.

<https://www.hhdelfland.nl/overheid/onderhoud-aan-water/DuckweedatinyaquaticplantwithgrowingpotentialStudentenUniversiteitvanUtrecht2015.pdf>

Bern, L. (1994). Particle selection over a broad size range by crustacean zooplankton. *Freshwater Biology*, 32, 105-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1994.tb00870.x>

Betini, G.S., Avgar, T., McCann, K.S. & Fryxell, J.M. (2017). *Daphnia* inhibits the emergence of spatial pattern in a simple consumer–resource system. *Ecology*, 98, 1163-1170. <http://www.doi.org/10.1002/ecy.1752>

Bhatia, A., Tomer, R., Kumar, V., Singh, S., & Pathak, S. (2012). Impact of tropospheric ozone on crop growth and productivity – a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 71(2), 97-112. <http://hdl.handle.net/123456789/13486>

Bhowmick, G. De, Sarmah, A.K., & Sen, R. (2019). Zero-waste algal biorefinery for bioenergy and biochar: A green leap towards achieving energy and environmental sustainability. *Sci. Total Environ*, 650, 2467–2482. <https://www.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.002>

Bielinska, M., & Nalecz-Jawecki, G. (2009). Pharmaceuticals in the environment. I: Evaluation of toxicity of three fluoroquinolones to duckweed *Lemna minor*. *Biul. Wydz. Farm. WUM*, 4, 24-30. <http://biuletynfarmacji.wum.edu.pl/0904Jawecki/Jawecki.html>

Bouali, M., Zrafi, I., Mouna, F., & Bakhrouf, A. (2012). Pilot study of constructed wetlands for tertiary wastewater treatment using duckweed and immobilized microalgae. *African Journal of Microbiology Research*, 6(31), 6066-6074. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.455>.

Bouterfas, R.; Belkoura, M. & Dauta, A. (2006). The effects of irradiance and photoperiod on the growth rate of three freshwater green algae isolated from a eutrophic lake. *Limnetica*, 25 (3), 647-656. <https://ddd.uab.cat/pub/limnetica/02138409v25n3/02138409v25n3p647.pdf>

Boxall, A. B. A., Brown, C. D., & Barrett, K. L. (2002). Higher-tier laboratory methods for assessing the aquatic toxicity of pesticides. *Pest Manage. Sci.*, 58, 637–648. https://www.acis.famic.go.jp/acis/chouken/chouken/boxallgenbun_2013.pdf

Brilman, D. W. F., Drabik, N., & Wądrzyk, M. (2017). Hydrothermal co-liquefaction of microalgae, wood, and sugar beet pulp. *Biomass Convers. Biorefinery*, 7, 445–454. <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0241-2>

Brusseau, M. L., Matthias, A. D., Comrie, A. C., & Musil, S. A. (2019). Atmospheric Pollution. In M. L. Brusseau, J. L. Pepper & C. P. Gerba (Eds.), *Environmental and Pollution Science* (pp. 293-309). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814719-1.00017-3>

Bundschuh, M. (2014). The Challenge: Chemical and ecotoxicological characterization of wastewater treatment plant effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(11), 2407. <https://doi.org/10.1002/etc.2713>

Cai, T., Park, S.Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, 19, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>

- Cairns, J., Bidwell, J.R., & Arnegard, M.E. (1996). Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms, and wholesystem manipulations. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 147, 45–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4058-7_2
- Cao, G., & Orrù, R. (Eds). (2014). *Current Environmental issues and challenges*. Dordrecht: Springer. <http://www.doi.org/10.1007/978-94-017-8777-2>
- Cassidy, K.O. (2011). *Evaluating algal growth at different temperatures* (Dissertação de Mestrado). Universidade de Kentucky, Lexington, Kentucky, EUA. https://uknowledge.uky.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1002&context=bae_etds
- Ceschin, S., Della Bella, V., Piccari, F., & Abati S. (2016). Colonization dynamics of the alien macrophyte *Lemna minuta* Kunth: a case study from a semi-natural pond in Appia Antica Regional Park (Rome, Italy). *Fundam. Appl. Limnol.*, 188, 93–101. <http://www.doi.org/10.1127/fal/2016/0870>
- Ceschin, S., Sgambato, V., Ellwood, N., & Zuccarello, V. (2019). Phytoremediation performance of *Lemna* communities in a constructed wetland system for wastewater treatment. *Environmental and Experimental Botany*, 162, 67-71. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.007>
- Chabukdhara, M., Gupta, S. K., & Gogoi, M. (2017). Phycoremediation of heavy metals coupled with generation of bioenergy. In S. K. Gupta, A. Malik & F. Bux (Eds), *Algal Biofuels* (pp.163-188). Springer International Publishing. Doi: [10.1007/978-3-319-51010-1_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-51010-1_9)
- Chandra, R., Iqbal, H. M. N., Vishal, G., Lee, H. S., & Nagra, S. (2019). Algal biorefinery: A sustainable approach to valorize algal-based biomass towards multiple product recovery. *Bioresour. Technol.*, 278, 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.104>
- Chekroun, K.B., & Baghour, M. (2013). The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. *J. Mater. Environ. Sci.*, 4(6), 873-880. <https://www.amu.ac.in/emp/studym/99998052.pdf>
- Cheng, J., Bergman, B. A., Classen, J. J., Stomp, A. M. & Howard, J. W. (2002a). Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource Technology*, 81, 81–85. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00098-0)
- Cheng, J., Landesman, L., Bergmann, B. A., Classen, J. J, Howard, J. W., & Yamamoto, Y.T. (2002b). Nutrient removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627. *Trans ASAE*, 45(4), 1003–1010. <http://www.doi.org/10.13031/2013.9953>
- Chinnasamy, S., Ramakrishnan, B., Bhatnagar, A., & Das, K. C. (2009). Biomass production potential of a wastewater alga *Chlorella vulgaris* ARC 1 under elevated levels of CO₂ and temperature. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 518–532. <https://doi.org/10.3390/ijms10020518>
- Chiu, S. Y., Kao, C. Y., Chen, T. Y., Chang, Y. B., Kuo, C. M., & Lin, C. S. (2015). Cultivation of microalgal *Chlorella* for biomass and lipid production using wastewater as nutrient resource. *Bioresource Technology*, 184, 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.080>
- Cho, S., Luong, T. T., Lee, D., Oh, Y., & Lee, T. (2011). Reuse of Effluent Water from a Municipal Wastewater Treatment Plant in Microalgae Cultivation for Biofuel Production. *Bioresource Technology*, 102, 8639-8645. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.037>
- Choi, H. J., & Lee, S. M. (2015). Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38(4), 761–766.

<https://doi.org/10.1007/s00449-014-1317-z>

Choi, H., & Lee, S. (2014). Effect of N/P Ratio on the Biomass Productivity and Nutrient Removal in the Wastewater using *Botryococcus braunii*. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 36, 609-613. <http://www.doi.org/10.4491/KSEE.2014.36.9.609>

Cid, A., Prado, R., Rioboo, C., Suarez-Bregua, P., & Herrero, C. (2012). Use of Microalgae as Biological Indicators of Pollution: Looking for New Relevant Cytotoxicity Endpoints. In M. N. Johnsen (Ed.), *Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy* (pp. 311-323). New York : Nova Science Publishers. <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/16634>

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., & Eaton, A.D. (Eds.). (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (20 th edition). *EUA*: APHA, AWWA, WEF.

Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process. : Process Intensif.*, 48(6), 1146-1151. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2009.03.006>

Costa, C. R., Olivi, P., Botta, C. M. R., & Espindola, E. L. G. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. *Quimica Nova*, 31(7), 1820–1830. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>

Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste water treatment (OJ L 135 30.05.1991 p. 40). (2006). In P. Sands & P. Galizzi (Eds.), *Documents in European Community Environmental Law* (pp. 851-864). Cambridge: Cambridge University Press.

Cristovão, M. (2016). *Microalgae treatment of piggery wastewater* (Dissertação de Mestrado). Instituto Superior Técnico, Lisboa.

Cuellar-Bermudez, S. P., Aleman-Nava, G. S., Chandra, R., Garcia-Perez, J. S., Contreras-Angulo, J. R., Markou, G., Parra-Saldivar, R. (2017). Nutrients utilization and contaminants removal. A review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. *Algal Research*, 24, 438-449. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.08.018>

Cui, W., & Cheng, J.J. (2015). Growing duckweed for biofuel production: a review. *Plant Biol. J.*, 17, 16–23. <https://doi.org/10.1111/plb.12216>

Culley, D. D., Jr., Rejmánková, E., Květ, J. & Frye, J.B. (1981). Production, chemical quality and use of duckweeds (*lemnaceae*) in aquaculture, waste management, and animal feeds. *Journal of the World Mariculture Society*, 12, 27-49. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1981.tb00273.x>

Cunha, J. P. A. R., Alves, G. S., & Reis, E.F. (2010). Efeito da temperatura nas características físico-químicas de soluções aquosas com adjuvantes de uso agrícola. *Planta Daninha*, 28(3), 665-672. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000300024>

Daam, M.A., & Van den Brink, P.J., (2011). Risk Assessment of Agrochemicals on Irrigation Water Quality. *Acta Horticulturae*, 922, 41-47. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.922.4>

Dahmani, S., Zerrouki, D., Ramanna, L., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in Outdoor Open Raceway Pond Using Domestic Wastewater as Medium in Arid Desert Region. *Bioresource Technology*, 219, 749-752. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.019>

Darley, W. M. (1982). *Algal Biology: A Physiological Approach (Basic Microbiology)*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Decreto-Lei n.º 77/2006 de 30 de março (2006). Complementa a transposição da Diretiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, que estabelece um quadro de acção comunitária no domínio da política da água, em desenvolvimento do regime fixado na Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro. Diário da República n.º 64/2006, Série I-A.

Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de setembro (2010). Estabelece as normas de qualidade ambiental no domínio da política da água e transpõe a Diretiva n.º 2008/105/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 16 de dezembro, e parcialmente a Diretiva n.º 2009/90/CE, da Comissão, de 31 de julho. Diário da República n.º 187/2010, Série I.

Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho (2012). Ministério da Agricultura, do Mar, do Ambiente e do Ordenamento do Território. Diário da República: Série I No 130. Acedido a 25 fev. 2020. Disponível em <https://data.dre.pt/eli/dec-lei/130/2012/06/22/p/dre/pt/html>

Decreto-Lei n.º 152/97 de 19 de junho. (1997). Transposição para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio de 1991, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. Diário Da República: I Série, No 139, 2959–2967. Retirado de <https://dre.pt/application/file/a/365412>

Decreto-Lei n.º 198/2008 de 8 de outubro. (2008). Terceira alteração ao Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, que transpõe para o direito interno a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio, relativamente ao tratamento de águas residuais urbanas. Diário Da República: I Série, 195(1.a série), 594–606. Retirado de http://www.oern.pt/documentos/legislacao/d_dl_dr/DL198_2008.pdf%5Cnhttps://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2008/10/19500/0713007133.pdf

Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto. (1998). Estabelece normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos. Revoga o Decreto-Lei n.º 74/90, de 7 de Março. Diário Da República: I Série, No 176, 3676–3722. Retirado de <https://dre.pt/application/conteudo/430457>

Decreto-Lei n.º 245/2009 de 22 de setembro. (2009). Estabelecimento do regime de utilização dos recursos hídricos, determinando que toda a utilização privativa carece de um título de utilização a ser emitido por uma administração de região hidrográfica (ARH). Diário Da República: I Série, 2008–2009.

Decreto-Lei n.º 261/99 de 7 de julho. (1999). Altera o Decreto-Lei n.º 152/97, de 19 de junho, com a redacção que lhe foi dada pelo Decreto-Lei n.º 348/98, de 9 de novembro, que transpõem para o direito interno, respectivamente, as Diretivas n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio, e 98/15/CE, d. Diário Da República: I Série.

Decreto-Lei n.º 348/98 de 9 de novembro. (1998). Procede à transposição para o direito interno da Diretiva n.º 98/15/CE, da Comissão, de 21 de fevereiro, que altera a Diretiva n.º 91/271/CEE, do Conselho, de 21 de maio, no que respeita a determinados requisitos estabelecidos no seu anexo I. Diário Da República: I Série, 5982–5983.

Delgadillo-Mirquez, L., Filipa, L., Behnam, T., & Dominique, P. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnol. Rep.*, 1, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>

DeLuca, S. J., Chao, A. C., & Smallwood Jr. C. (1983). Ames test of ferrate treated water. *J. Environ. Eng.*, 109, 1159-1167.

Dodson, S. I., & Frey, D. G. (2001). Cladocera and other Branchiopoda. In J. H. Thorp & A. P. Covich (Eds.), *Ecology and classification of North American freshwater invertebrates* (pp. 850- 914). London: Academic Press. <http://www.doi.org/10.1016/B978-012690647-9/50022-3>

DQA- Diretiva 2000/60/CE de 23 de outubro. (2000). Diretiva-Quadro da Água. *Jornal Oficial Das Comunidades Europeias*, (7), 1–72.

Dussart, G., Robertson, J., & Bramley, J. (1993). Death of a lake. *Biol. Sci. Rev.*, 5(5), 8–10.

Ebert, D. (2005). *Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia* (Chapter 2, Introduction to *Daphnia* Biology). Bethesda, EUA: National Center for Biotechnology Information. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2042/>

EC (European Communities), (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. Official Journal of the European Communities L 327, pp. 0001–0073 (22/12/2000, Brussels, Belgium).

Edmondson, W. T., & Litt, A. H. (1982). *Daphnia* in Lake Washington. *Limnology and Oceanography*, 27(2), 272-293. <https://doi.org/10.4319/lo.1982.27.2.0272>

Edwards, P., Hassan, M. S., Chau, C. H. & Pacharaprakiti, C. (1992). Cultivation of duckweeds in septage-loaded earthen ponds. *Biores. Techn.*, 40, 109-117. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(92\)90195-4](https://doi.org/10.1016/0960-8524(92)90195-4)

EPA (United States Environmental Protection Agency) – “Short-term Methods for estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms” – Fourth Edition, 2002. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-08/documents/short-term-chronic-freshwater-wet-manual_2002.pdf

EU Science HUB – <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods/aquatic-toxicity>

Farré, M. & Barcelo, D. (2003). Toxicity Testing of Wastewater and Sewage Sludge by Biosensors, Bioassays and Chemical Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(5), 299-310. [http://www.doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00504-1](http://www.doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00504-1).

Fernícola, N. G. G., & Azevedo, F. A. (1981). Metemoglobinemia e nitrato nas águas. *Rev. Saúde Pública*, 15(2), 242-248. <https://www.scielo.br/pdf/rsp/v15n2/09.pdf>

Fewtrell, L. (2004). Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: a discussion. *Environmental health perspectives*, 112(14), 1371–1374. <https://doi.org/10.1289/ehp.7216>

Filbin, G. J., & Hough, A. R. (1985). Photosynthesis, photorespiration and productivity in *Lemna minor*. *L. Oceanography*, 30(2), 322-334. <https://doi.org/10.4319/lo.1985.30.2.0322>

- Flynn, K.J., Kenny, P. & Mitra, A. (2017). Minimising losses to predation during microalgae cultivation. *J Appl Phycol* 29, 1829–1840. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1112-8>
- Fogg, G. E. (1975). *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology* (2nd edition). Wisconsin: The University of Wisconsin Press. <https://doi.org/10.1002/iroh.19660510116>
- Ford, D. L. (Ed.). (1998). *Toxicity Reduction: Evaluation and Control, Volume III*. EUA: Technomic Publishing Company.
- Goher, M. E., Abd El-Monem, A. M., Abdel-Satar, A. M., Ali, M. H., Hussian, A. M., & Napiórkowska-Krzebietke, A. (2016). Biosorption of some toxic metals from aqueous solution using non-living algal cells of *Chlorella vulgaris*. *J. Elem.*, 21(3), 703 - 714, <http://www.doi.org/10.5601/jelem.2015.20.4.1037>
- Goldberg, I. K., & Cohen, Z. (2006). The Effect of Phosphate Starvation on the Lipid and Fatty Acid Composition of the Fresh Water Eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67, 696-701. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.01.010>
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C., & Simões, M. D. (2016). The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. *RSC ADVANCES*, 6, 22896-22907. <http://doi.org/10.1039/C5RA26117A>
- Görs, M., Schumann, R., Hepperle, D. & Karsten U. (2010). Quality analysis of commercial *Chlorella* products used as dietary supplement in human nutrition. *J. Appl. Phycol.*, 22, 265–276. <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9455-4>
- Gouveia, R. (2018). *Eficiência de remoção de microplásticos em quatro ETAR portuguesas* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica. Retirada de: <https://run.unl.pt/handle/10362/50893>
- Gray, N. (2004). *Biology of Wastewater Treatment* (2nd Edition). London: Imperial College Press.
- Greenwood, M. C. (2020). *Intermediate Statistics with R*. <https://doi.org/10.15788/2019.08.19>
- Guemmaz, F., Neffar, S., & Chenchouni, H. (2019). Physicochemical and Bacteriological Quality of Surface Water Resources Receiving Common Wastewater Effluents in Drylands of Algeria. In A. M. Negm, A. Bouderbala, H. Chenchouni, & D. Barceló (Eds), *Water Resources in Algeria - Part II* (pp. 117-148). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6000-0_400
- Harker, M., Tsavalos, A. J., & Young, A. J. (1996). Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *J. Ferment. Bioeng.*, 82(2), 113–118. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)85031-8](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)85031-8)
- Hasan, M. R., Chakrabarti, R., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2009). *Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: A review*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- Hörtensteiner, S., Chinner, J., Matile, P., Thomas, H., & Donnison, I. S. (2000). Chlorophyll breakdown in *Chlorella protothecoides*: characterization of degreening and cloning of degreening-related genes. *Plant Molecular Biology*, 42(3), 439–450. <https://doi.org/10.1023/a:1006380125438>
- Howarth, W. (2006). The progression towards ecological quality standards. *J. Environ. Law.*, 18, 3–35. <http://www.doi.org/10.1093/jel/eqi049>

- Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R., & Yuan, Z. (2012). Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter South China. *Bioresource Technology*, 121, 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.012>
- ISO/DIS 20079 (2004). *Water quality- determination of the toxic effect of water constituents and wastewater to duckweed (Lemna minor) – Duckweed growth inhibition test*. ISO TC 147/SC 5WG 5.
- Jackson, G. A. (1980). Marine biomass production through seaweed aquaculture. In A. San Pietro (Ed), *Biochemical and Photosynthetic Aspects of Energy Production* (pp. 31-58). New York: Academic Press.
- Jane, A. (2017). *Tratamento de Águas Residuais e Gestão de Lamas Fecais em Moçambique: Ponto de Situação, Desafios e Perspetivas* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.
- Ji, M., Abou-Shanab, R.A.I., Kim, S., Salama, E., Lee, S., Kabra, A.N., Lee, Y., Hong, S. & Jeon, B. (2013). Cultivation of Microalgae Species in Tertiary Municipal Wastewater Supplemented with CO₂ for Nutrient Removal and Biomass Production. *Ecological Engineering*, 58, 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.06.020>
- Kanwal, S., Sajjad, M., Gabriel, H.F., & Hussain E. (2020). Towards sustainable wastewater management: A spatial multi-criteria framework to site the Land-FILTER system in a complex urban environment, *Journal of Cleaner Production*, 266. <http://www.doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121987>
- Khalil, Z. I., Asker, M. M., El-Sayed, S., & Kobbia, I. A. (2010). Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. *World journal of microbiology & biotechnology*, 26(7), 1225–1231. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0292-z>
- Khoeyi, Z.A., Seyfabadi, J., & Ramezanzpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquacult. Int.*, 20(1), 41-49. <https://doi.org/10.1007/s10499-011-9440-1>
- Kimball, S., Mattis, P., & the GIMP Development Team (2014). GIMP version 2.8.14
- Körner, S. & Vermaat, J. E. (1998). The relative importance of *Lemna gibba* L., bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed-covered domestic wastewater. *Water Research*, 32, 3651-3661. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(98\)00166-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(98)00166-3)
- Körner, S., Vermaat, J. E., & Veenstra, S. (2003). The capacity of duckweed to treat wastewater: ecological considerations for a sound design. *Journal of environmental quality*, 32(5), 1583–1590. <https://doi.org/10.2134/jeq2003.1583>
- Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S., Kumar, A., Pathak, V. & Tyagi, V. (2017). Microalgal cultivation for value-added products: a critical enviro-economical assessment. *3 Biotech* 7, 243. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8>
- Koutra, E., Economou, C. N., Tsafrakidou, P., & Kornaros, M. (2018). Bio-Based Products from Microalgae Cultivated in Digestates. *Trends in Biotechnology*, 6(8), 819-833. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.02.015>
- Kring, S. A., Xia, X., Powers, S. E., & Twiss, M.R. (2013). Crustacean zooplankton in aerated wastewater treatment lagoons as a potential feedstock for biofuel. *Environ. Technol.*, 34(13-14), 1973-1981. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.795985>

Lakaniemi, A. M., Intihar, V. M., Tuovinen, O. H., & Puhakka, J. A. (2012). Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial biotechnology*, 5(1), 69–78.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00298.x>

Lampert, W., Fleckner, W., Rai, H., & Taylor, B. (1986). Phytoplankton Control by Grazing Zooplankton: A Study on the Spring Clear-Water Phase. *Limnology and Oceanography*, 31(3), 478-490.
<https://doi.org/10.4319/lo.1986.31.3.0478>

Landesman, L. (2000). Effects of herbivory and competition on growth of Lemnaceae in systems for wastewater treatment and livestock feed production (Tese de Doutorado). Universidade de Louisiana, Louisiana, EUA.

Larsdotter, K. (2006). Wastewater Treatment with Microalgae—A Literature Review. *Vatten*, 62, 31-38.

Lasfar, S., Monette, F., Millette, L., & Azzouz, A. (2007). Intrinsic growth rate: a new approach to evaluate the effects of temperature, photoperiod and phosphorus-nitrogen concentrations on duckweed growth under controlled eutrophication. *Water Research*, 41(11), 2333–2340.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.01.059>

Lass, S., & Spaak, P. (2003). Chemically induced anti-predator defences in plankton: a review. *Hydrobiologia*, 491(1), 221-239. <https://doi.org/10.1023/A:1024487804497>

Lau, P.S., Tam, N.F.Y., & Wong, Y.S. (1996). Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella Vulgaris*: Optimization Through Acclimation, *Environmental Technology*, 17(2), 183-189.
<https://doi.org/10.1080/09593331708616375>

Lau, P.S., Tam, N.F.Y., & Wong, Y.S. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ. Pollut.*, 89, 56–66. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)00044-E](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)00044-E)

Lavriničs, A., & Juhna, T. (2017). Review on Challenges and Limitations for Algae-Based Wastewater Treatment, *Construction Science*, 20(1), 17-25. doi: <https://doi.org/10.2478/cons-2017-0003>

Lei n.º 58/2005 de 29 de dezembro (2005). Aprova a Lei da Água, transpondo para a ordem jurídica nacional a Diretiva n.º 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro, e estabelecendo as bases e o quadro institucional para a gestão sustentável das águas.

Leite, A. (2014). *Desinfecção de Efluentes Urbanos através de Doseamento de Cloro* (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.

Lemon, G. D., Posluszny, U., & Husband, B. C. (2001). Potential and realized rates of vegetative reproduction in *Spirodela polyrhiza*, *Lemna minor*, and *Wolffia borealis*. *Aquat. Bot.*, 70, 79–87.
[https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(00\)00131-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(00)00131-5)

Leng, R. A., Stambolie, J. H., & Bell, R. W. (1995). Duckweed - a potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. *Proceedings of the AAAP Conference* (pp. 103-114). Bali, Indonésia.

Liu, M., Huang, X., Song, Y., Tang, J., Cao, J., Zhang, Zhu, T. (2019). Ammonia emission control in China would mitigate haze pollution and nitrogen deposition, but worsen acid rain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(16), 7760–7765.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1814880116>

Long, J. D., Smalley, G. W., Barsby, T., Anderson, J. T., & Hay, M. E. (2007). Chemical cues induce consumer-specific defenses in a bloom-forming marine phytoplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(25), 10512–10517. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611600104>

Maia, N. B., Martos, H. L., Barrella, W. (Eds.). (2001). *Indicadores ambientais: Conceitos e aplicações*. São Paulo: Educ.

Makareviciene, V., Andrulevičiūtė, V., Skorupskaitė, V., & Kasperovičienė, J. (2011). Cultivation of Microalgae *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. as a Potential Biofuel Feedstock. *Environmental Research, Engineering and Management*, 3(57), 21-27. <https://hdl.handle.net/20.500.12259/83744>

Makarigakis, A., & Jimenez-Cisneros, B. (2019). UNESCO's Contribution to Face Global Water Challenges. *Water*, 11(2), 388. <https://doi.org/10.3390/w11020388>

Maltby, L., Clayton, S. A., Yu, H., Mcloighlin, N., Wood, R. M., & Yin, D. (2000). Using single-species toxicity tests, community-level responses, and toxicity identification evaluations to investigate effluent impacts. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 151–157. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190118>

Manusadžianas, L., Balkelytė, L., Sadauskas, K., Blinova, I., Pöllumaa, L. & Kahru, A. (2003). Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. *Aquatic Toxicology*, 63, 27-41. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00132-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00132-7)

McLay, C. L. (1976). The effect of pH on the population growth of three species of duckweed: *Spirodela oligorhiza*, *Lemna minor* and *Wolffia arrhiza*. *Freshwater Biology*, 6, 125-136.

Memória Descritiva e Justificativa do Processo de Tratamento e Equipamento da ETAR de Quinta do Conde - Projeto de Execução.

Metcalf & Eddy. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery* (4th edition). New York: McGraw-Hill Education.

Microsoft Corporation (2013). Microsoft Paint.

Microsoft Corporation (2019). Microsoft Excel 365.

Min, M., Wang, L., Li, Y., Mohr, M. J., Hu, B., Zhou, W., Chen, P., & Ruan, R. (2011). Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(1), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9238-7>

Mishra, S., Roy, M., & Mohanty, K. (2019). Microalgal bioenergy production under zero-waste biorefinery approach: Recent advances and future perspectives. *Bioresource Technology*, 292, 122008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122008>

Mkandawire, M., & Dudel, E. G. (2007). Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents?. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 1(1), 56–71.

Mohamed, R. M., Al-Gheethi, A. A., Aznin, S. S., Hasila, A. H., Wurochekke, A. A., & Kassim, A.H. (2017). Removal of nutrients and organic pollutants from household greywater by phycoremediation for safe disposal. *Int. J. Energy Environ. Eng.*, 8, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s40095-017-0236-6>

Mohedano, R. A. (2010). *Uso de macrófitas lemnáceas (Landoltia punctata) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono* (Tese (Doutoramento)). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Mohedano, R. A., Costa, R. H., Tavares, F. A., & Belli Filho, P. (2012a). High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. *Bioresource Technology*, 112, 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.083>

Mohedano, R. A., Velho, V. F., Costa, R. H., Hofmann, S. M., & Belli Filho, P. (2012b). Nutrient recovery from swine waste and protein biomass production using duckweed ponds (*Landoltia punctata*): southern Brazil. *Water science and technology: a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 65(11), 2042–2048. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.111>

Montemezzani, V., Duggan, I. C., Hogg, I. D., & Craggs, R. J. (2015). A review of potential methods for zooplankton control in wastewater treatment High Rate Algal Ponds and algal production raceways. *Algal Research*, 11, 211-226. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.06.024>

Moore, G. T. (2010). *Nutrient control design manual*. U.S. Environmental Protection Agency (EPA) Office of Research and Development.

Munirasu S., Uthayakumar V., Arunkumar P. & Ramasubramanian V. (2016). The effect of different feeds such as *Chlorella vulgaris*, *Azolla pinnata* and yeast on the population growth of *Daphnia magna* commonly found in freshwater systems. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 4(6), 5-10.

Muradov, N., Taha, M., Miranda, A. F., Kadali, K., Gujar, A., Rochfort, S., Stevenson, T., Ball, A. S., & Mouradov, A. (2014). Dual application of duckweed and azolla plants for wastewater treatment and renewable fuels and petrochemicals production. *Biotechnol. Biofuels*, 7, 30. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-30>

National Institute of Health. (2018). *ImageJ*. Wisconsin: National Institute of Health.

NC DEQ (North Carolina Environmental Quality), Aquatic toxicity testing understanding and implementing your testing requirement, Aquatic toxicology branch, Water Sciences Section N.C. Division of Water Resources. <https://deq.nc.gov/about/divisions/water-resources/water-resources-data/water-sciences-home-page/aquatic-toxicology-branch/downloads>

Newman, M. C., & Unger, M.A. (2003). *Fundamentals of Ecotoxicology* (2nd Edition). Boca Raton: Lewis Publisher.

Nichols, H. W., & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *J. Phycol.*, 1, 34–8. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.1965.tb04552.x>

Öbek, E., & Hasar, H. (2002). Role of duckweed (*Lemna minor*) harvesting in biological phosphate removal from secondary treatment effluents. *Fresenius Environmental Bulletin*, 11, 27–29.

OECD. (2011). *Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264069923-en>.

OECD. (2006). Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test. Guideline for Testing Chemicals (pp. 1-26). <https://doi.org/10.1787/9789264016194-en>

Oliver, S., Corburn, J., & Ribeiro, H. (2018). Challenges Regarding Water Quality of Eutrophic Reservoirs in Urban Landscapes: A Mapping Literature Review. *International journal of environmental research and public health*, 16(1), 40. <https://doi.org/10.3390/ijerph16010040>

Onay, M. (2018). Investigation of Biobutanol Efficiency of *Chlorella* sp. Cultivated in Municipal Wastewater. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 6, 40-50. <https://www.doi.org/10.4236/gep.2018.610003>

Osundeko, O. (2014). *Sustainable Production of Biofuel from Microalgae grown in wastewater* (Tese de Doutoramento). University of Manchester, Manchester.

Özengin, N., & Elmaci, A. (2007). Performance of duckweed (*Lemna minor*) on different types of wastewater treatment. *Journal of environmental biology*, 28(2), 307–314.

Pandey, S. (2006). Water pollution and health. *Kathmandu University Medical Journal (KUMJ)*, 4(1), 128–134.

Park, J. B., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource technology*, 102(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>

Pescod, M. B. (1992). *Wastewater treatment and use in agriculture - FAO irrigation and drainage*. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).

Pilon-Smits, E. (2005). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 56, 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>

Power, E. A., & Boumphrey, R. S. (2004). International trends in bioassay use for effluent management. *Ecotoxicology*, 13, 377–398. <https://doi.org/10.1023/B:ECTX.0000035290.89590.03>

Pradhan, S. P., Conrad, J. R., Paterek, J. R., & Srivastava, V. J. (1998). Potential of Phytoremediation for Treatment of PAHs in Soil at MGP Sites. *Journal of Soil Contamination*, 7(4), 467-480. <http://www.doi.org/10.1080/10588339891334401>

Pulford, I. D., & Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees--a review. *Environment international*, 29(4), 529–540. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00152-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00152-6)

Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R., & Hofnung, M. (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(19), 5971–5975. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.19.5971>

R Foundation for Statistical Computing (2016). R version 3.2.4

Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Marijanović Rajčić, M., Sirac, S., Pevalek-Kozlina, B., & Pavlica, M. (2011). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.06.011>

Rahman, U. R., Ismail, S. N., Abidin, E. Z., & Mangala, P. S. (2014). Landfill Leachate Toxicity Analysis with *Oreochromis mossambicus* (Mozambique Tilapia): A Review. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 18, 198-216.

Raju, A. R., Anitha, C. T., Sidhimol, P. D., & Rosna K. J. (2010). Phytoremediation of domestic wastewater by using a free-floating aquatic angiosperm, *Lemna minor*. *Nat. Environ. Pollut. Technol.*, 9, 83–88.

Rekacewicz, P. (2012). *Freshwater stress 1995 and 2025*. Disponível em: http://www.grida.no/graphicslib/detail/freshwater-stress-1995-and-2025_6250.

Riaño, B., Molinuevo, B., & García-González, M. C. (2011). Treatment of fish processing wastewater with microalgae-containing microbiota. *Bioresource technology*, 102(23), 10829–10833. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.022>

Rodrigues, A. M. F. (1990). *Contribuição para o estudo de lagoas fotossintéticas de alta carga (LFAC) no tratamento de efluentes orgânicos e na produção de biomassa*. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica.

Roijackers, R., Szabó, S., & Scheffer, M. (2004). Experimental analysis of the competition between algae and duckweed. *Archiv für Hydrobiologie*, 160(3), 401-412. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2004/0160-0401>

Sadava, D., Hillis, D., Heller, H. & Berenbaum, M. (2009). *Life: The Science of Biology* (9th Edition). MA: Sinauer Associates.

Saeger, A. (1925). The growth of duckweeds in mineral nutrient solutions with and without organic extracts. *The Journal of general physiology*, 7(4), 517–526. <https://doi.org/10.1085/jgp.7.4.517>

Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P-Y, & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Sakarika, M., & Kornaros, M. (2019). *Chlorella vulgaris* as a green biofuel factory: Comparison between biodiesel, biogas and combustible biomass production. *Bioresource Technology*, 273, 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.11.017>

Salama, E. S., Kurade, M. B., Abou-Shanab, R. A. I., El-Dalatony, M. M., Yang, I. S., Min, B., & Jeon, B. H. (2017). Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1189-1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>

Salgueiro, J., Perez, L., Maceiras, R., Sanchez, A., & Cancela, A. (2016). Bioremediation of Wastewater using *Chlorella vulgaris* Microalgae: Phosphorus and Organic Matter. *International Journal of Environmental Research*, 10(3), 465-470.

Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 49, 643–668. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>

Sanderson, H., Boudreau, T. M., Mabury, S. A., & Solomon, K. R. (2004). Effects of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid on the zooplanktonic community. *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(1), 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.09.012>

Sawyer, C. N., McCarty, P. L. & Parkin, G. F. (2003). *Chemistry for Environmental and Engineering Science* (5th Edition, pp. 587-590). New York: McGraw Hill Inc.

- Schindler, D. (1998). Whole-Ecosystem Experiments: Replication Versus Realism: The Need for Ecosystem-Scale Experiments. *Ecosystems* 1, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s100219900026>
- Seyfabadi, J., Ramezanpour, Z., & Khoey, Z. A. (2011). Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes, *J. Appl. Phycol.*, 23, 721–726. DOI 10.1007/s10811-010-9569-8
- Shamala, T. R., Drawert, F., & Leupold, G. (1982). Studies on *Scenedesmus acutus* growth II. Effect of autotrophic and mixotrophic growth on the amino acid and the carbohydrate composition of *Scenedesmus acutus*. *Biotechnology and bioengineering*, 24(6), 1301–1317. <https://doi.org/10.1002/bit.260240606>
- Silva, A., Figueiredo, S. A., Sales, M. G., & Delerue-Matos, C. (2009). Ecotoxicity tests using the green algae *Chlorella vulgaris* - A useful tool in hazardous effluents management. *Journal of Hazardous Materials*, 167(1–3), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.12.102>
- Silva, C. (2014). *Ocorrência e destino de estrogénios e antibióticos no ambiente, avaliados por metodologias analíticas de baixo custo* (Tese de Doutoramento). Universidade de Aveiro, Aveiro.
- SIMARSUL - [acedido em 11 de fevereiro de 2020] Disponível em https://www.simarsul.adp.pt/sites/simarsul.adp.pt/files/publish/etar_quinta_conde_site.jpg
- Simarsul (2012). Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) da Quinta do Conde. Sistema Integrado Multimunicipal de Águas Residuais da Península de Setúbal.
- SIMARSUL (2019). Controlo analítico QTC (Ficheiro Excel).
- Singh, R. P., Kolok, A. S., & Bartelt-Hunt, S. L. (Eds). (2019). *Water Conservation, Recycling and Reuse: Issues and Challenges*. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-3179-4>
- Singh, R., Birru, R. & Sibi, G. (2017). Nutrient Removal Efficiencies of *Chlorella vulgaris* from Urban Wastewater for Reduced Eutrophication. *Journal of Environmental Protection*, 8, 1-11. <http://www.doi.org/10.4236/jep.2017.81001>
- Singh, S. P. & Singh, P. (2015). Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 431-444. <http://www.doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.024>
- Smith, K., Liu, S., Liu, Y., & Guo, S. (2019). Can China reduce energy for water? A review of energy for urban water supply and wastewater treatment and suggestions for change. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 91, 41–58. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.051>
- Stein, J. R. (1973). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods & Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Swartzman, G., Taub, F., Meador, J., Huang, C., & Kindig, A. (1990). Modeling the effect of algal biomass on multispecies aquatic microcosms response to copper toxicity. *Aquatic Toxicology*, 17, 93-117. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(90\)90025-K](https://doi.org/10.1016/0166-445X(90)90025-K)
- Szabo, S., Roijackers, R. M. M., Scheffer, M., & Borics, G. (2005). The strength of limiting factors for duckweed during algal competition. *Archiv für Hydrobiologie*, 164(1), 127-140. <https://doi.org/10.1127/0003-9136/2005/0164-0127>

- Szczerbińska, N., & Gałczyńska, M. (2015). Biological methods used to assess surface water quality. *Fisheries & Aquatic Life*, 23(4), 185-196. <https://doi.org/10.1515/aopf-2015-0021>
- Tabou, T. T., Baya, D. T., Eyul'anki, D. M., & Vassel, J. L. (2014). Monitoring the influence of light intensity on the growth and mortality of duckweed (*Lemna minor*) through digital images processing. *Biotechnology, Agronomy, Social, Environmental*, 18, 37-48.
- Talbot, P., & De la Noüe, J. (1993). Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research*, 27 (1), 153–159. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90206-W](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90206-W)
- Tatar, S., Obek, E., Arslan Topal, E., & Topal, M. (2019). Uptake of Some Elements with Aquatic Plants Exposed to the Effluent of Wastewater Treatment. *Plant. Pollution*, 5(2), 377-386. doi: 10.22059/poll.2019.269722.542
- Teoh, M. L., Phang, S. M., & Chu, W. L. (2013). Response of Antarctic, temperate, and tropical microalgae to temperature stress. *Journal of Applied Phycology*, 25(1), 285–297. <https://www.doi.org/10.1007/s10811-012-9863-8>
- Tett, P., Droop, M., & Heaney, S. (1985). The Redfield Ratio and Phytoplankton Growth Rate. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 65(2), 487-504. <http://www.doi.org/10.1017/S0025315400050566>
- Tohill, I. E. & Turner, A. P. F. (1996). Developments in bioassay methods for toxicity testing in water treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(5), 178-188.
- Tyler, H. L., Moore, M. T., & Locke, M.A. (2012). Influence of Three Aquatic Macrophytes on Mitigation of Nitrogen Species from Agricultural Runoff. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(6), 3227–3236. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1104-x>
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019a). *World Population Prospects 2019, Total Population- Both Sexes* [Microsoft Excel spreadsheet]. [acedido em 11 de fevereiro de 2020] Disponível em <https://population.un.org/wpp/Download/Standard/Population/>
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019b). *World Population Prospects 2019: Highlights* (ST/ESA/SER.A/423).
- Upadhyay, R. K., Kumari, S., Kumar, P., & Rai, V. (2019). Spatial distribution of microalgae in marine systems: A reaction–diffusion model. *Ecological Complexity*, 39, 100771. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2019.100771>
- Usher, P. K., Ross, A. B., Camargo-Valero, M. A., Tomlin, A. S., & Gale, W.F. (2014). An overview of the potential environmental impacts of large scale microalgae cultivation. *Biofuels*, 5(3), 331–349. <http://www.doi.org/10.1080/17597269.2014.913925>
- Vadlamani, A., Viamajala, S., Pendyala, B., & Varanasi, S.V. (2017). Cultivation of Microalgae at Extreme Alkaline pH Conditions: A Novel Approach for Biofuel Production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5, 7284-7294. <https://www.doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b01534>
- Valderrama, L. T., Del Campo, C. M., Rodriguez, C. M., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and

the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, 36(17), 4185–4192. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00143-4](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00143-4)

Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>

Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution, Ser B*, 11, 1-14. [https://doi.org/10.1016/0143-148X\(86\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0143-148X(86)90028-5)

Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. *Environmental Research*, 52, 7- 22. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(05\)80147-1](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(05)80147-1)

Wong, Y. K., Ho, Y. H., Ho, K. C., Leung, H. M., & , K. K. L. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *J. Aquac. Mar. Biol.*, 6(1), 00143. <http://www.doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>

Wood, A. M., Everroad, R. C., & Wingard, L. M. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal. In R. A. Andersen (Ed.), *Algal Culturing Techniques* (pp. 269–285). Burlington, San Diego, Londres: Elsevier Academic Press.

Xu, H., Miao, X., & Wu, Q. (2006). High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.05.002>

Yu, G. C., Xin, X. F., Cai, Z. L., Shi, D. J., & Ouyang, F. (2000). Mixotrophic cultures of *Anabaena sp.* PCC7120. *Eng. Chem. Metal.*, 21, 52–57.

Yu, H., Kim, J. & Lee, C. (2019). Nutrient removal and microalgal biomass production from different anaerobic digestion effluents with *Chlorella* species. *Sci. Rep.*, 9, 6123. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42521-2>

Žaltauskaitė, J., Sujetovienė, G., & Čypaitė, A. (2014). *Lemna minor* as a tool for wastewater toxicity assessment and pollutants removal. *9th International Conference on Environmental Engineering, ICEE 2014*. Vilnius, Lituânia. <http://www.doi.org/10.3846/enviro.2014.104>

Zayed, A., Gowthaman, S., & Terry, N. (1998). Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *Journal of Environmental Quality*, 27, 715–721. <http://www.doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700030032x>

Zhao, Y., Ge, Z., Lui, H. and Sun, S. (2016), Ability of different microalgae species in synthetic high-strength wastewater treatment and potential lipid production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 91: 2888-2895. <https://doi.org/10.1002/jctb.4905>

Zehnder, A., & Gorham, P. R. (1960). Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* KÜTZ. EMEND. ELENKIN. *Canadian Journal of Microbiology*, 6, 645–660. <https://doi.org/10.1139/m60-077>

Ziegler, P., Adelman, K., Zimmer, S., Schmidt, C., & Appenroth, K. J. (2015). Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. *Plant Biology*, 17, 33–41. <https://doi.org/10.1111/plb.12184>

7. ANEXOS

7.1 **Anexo I** - Diagrama Linear esquematizado do tratamento da fase líquida e da fase sólida na ETAR da Quinta do Conde

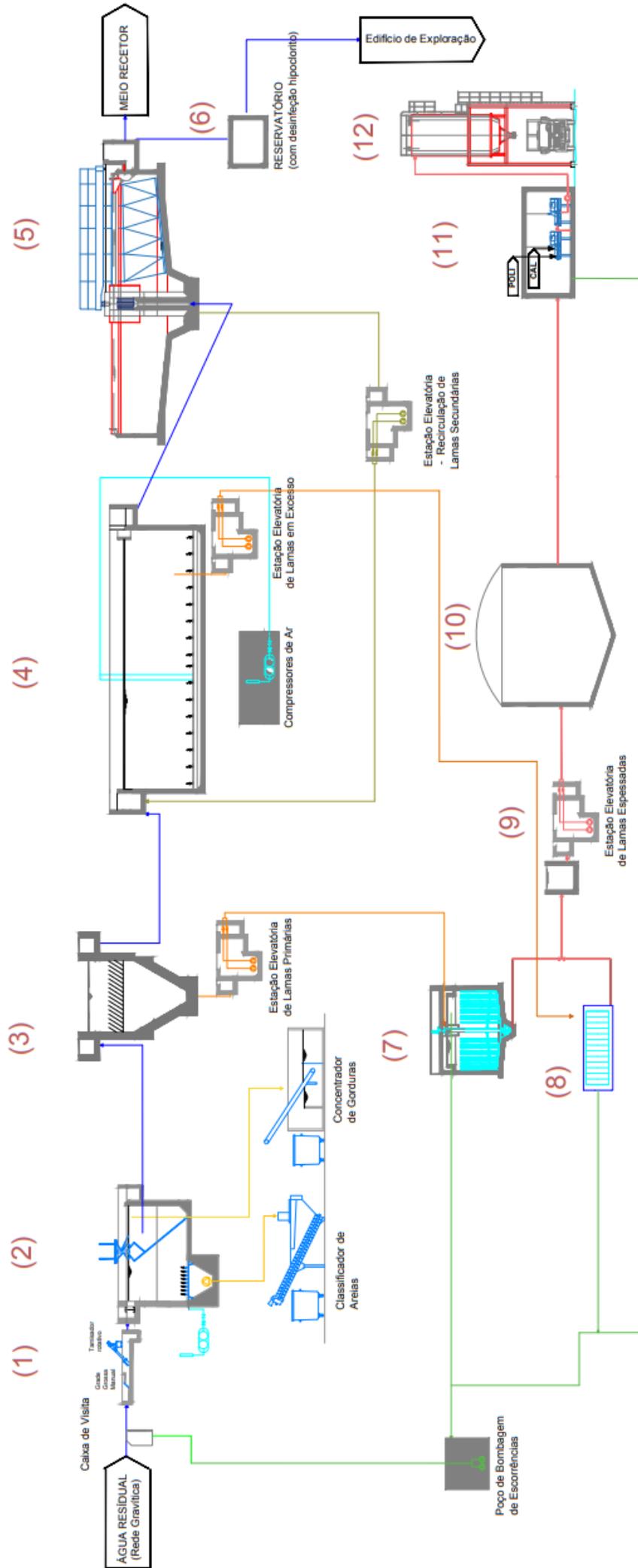


Figura A1.1- Diagrama Linear esquematizado do tratamento da fase líquida e da fase sólida na ETAR da Quinta do Conde.

7.2 **Anexo II – Tabelas de valores da reta de calibração, clorofila a, taxa de crescimento específico e desvio padrão da *Chlorella vulgaris***

Tabela AII.1 - Valores da reta de calibração.

| Clorofila a (µg/l) | Absorvência (683 nm) |
|-----------------------|-------------------------|
| 55 | 0,036 |
| 99 | 0,042 |
| 110 | 0,060 |
| 112 | 0,078 |
| 141 | 0,081 |
| 198 | 0,116 |
| 226 | 0,104 |
| 239 | 0,129 |
| 323 | 0,151 |
| 358 | 0,152 |
| 399 | 0,165 |
| 468 | 0,202 |
| 479 | 0,196 |

Tabela AII.2 - Valores da concentração de clorofila a (µg/l) ao longo do tempo no 1º ensaio (7dias)

(% - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| 1) Controlo | 59,828 | 136,347 | 262,999 | 360,626 | 405,482 | 1627,145 | 434,506 | 410,759 |
| 2) Controlo | 62,467 | 131,070 | 231,336 | 323,686 | 384,373 | 394,928 | 408,121 | 416,036 |
| 3) Controlo | 59,828 | 123,154 | 226,059 | 278,830 | 352,710 | 392,289 | 360,626 | 355,349 |
| 1) 100% | 125,792 | 381,735 | 790,715 | 780,161 | 693,087 | 347,433 | 674,617 | 809,185 |
| 2) 100% | 136,347 | 429,229 | 883,065 | 825,016 | 764,329 | 632,400 | 835,571 | 1065,127 |
| 3) 100% | 123,154 | 400,205 | 793,353 | 793,353 | 706,280 | 658,786 | 624,484 | 869,872 |
| 1) 75% | 109,961 | 352,710 | 666,702 | 600,737 | 537,411 | 606,014 | 579,628 | 648,231 |
| 2) 75% | 123,154 | 305,216 | 679,894 | 598,098 | 534,773 | 476,724 | 503,110 | 526,857 |
| 3) 75% | 123,154 | 452,976 | 788,076 | 716,835 | 640,316 | 455,615 | 645,593 | 943,753 |
| 1) 50% | 96,768 | 315,770 | 487,278 | 516,302 | 482,001 | 600,737 | 795,992 | 949,030 |
| 2) 50% | 99,407 | 310,493 | 532,134 | 463,531 | 434,506 | 613,930 | 819,739 | 930,560 |
| 3) 50% | 107,322 | 347,433 | 587,544 | 516,302 | 547,965 | 592,821 | 835,571 | 967,500 |
| 1) 25% | 67,744 | 334,240 | 627,123 | 859,318 | 1215,526 | 1584,928 | 1801,291 | 1891,003 |
| 2) 25% | 83,575 | 313,132 | 526,857 | 656,147 | 817,101 | 1220,804 | 2025,571 | 1226,081 |
| 3) 25% | 80,937 | 342,156 | 526,857 | 653,509 | 872,511 | 1231,358 | 1368,564 | 1526,879 |

Tabela AII.3 - Valores do desvio padrão da concentração de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) ao longo no tempo no 1º ensaio (7dias)

(% - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Controlo | 1,5234 | 6,6403 | 19,9790 | 40,9618 | 26,5611 | 712,1839 | 37,4393 | 33,6182 |
| 100% | 6,9810 | 23,9419 | 52,5734 | 23,0530 | 37,9014 | 172,6474 | 110,2851 | 133,7373 |
| 75% | 7,6169 | 75,4345 | 66,5948 | 67,8035 | 60,1882 | 81,4263 | 71,3068 | 214,4243 |
| 50% | 5,4926 | 16,3128 | 41,0090 | 24,8768 | 46,5236 | 8,7069 | 16,2653 | 15,0807 |
| 25% | 8,4819 | 15,0036 | 57,8886 | 118,0697 | 215,8213 | 207,2476 | 333,9690 | 332,9634 |

Tabela AII.4 - Valores médios da concentração de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) ao longo do tempo no 1º ensaio (7dias)

(% - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|
| Controlo | 61 | 130 | 240 | 321 | 381 | 805 | 401 | 394 |
| 100% | 128 | 404 | 822 | 800 | 721 | 546 | 712 | 915 |
| 75% | 119 | 370 | 712 | 639 | 571 | 513 | 576 | 706 |
| 50% | 101 | 325 | 536 | 499 | 488 | 602 | 817 | 949 |
| 25% | 77 | 330 | 560 | 723 | 968 | 1346 | 1732 | 1548 |

Tabela AII.5 - Taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* e desvio padrão no 1º ensaio.

(% - Concentração de água residual)

| Amostras (<i>C. vulgaris</i>) | Taxa de crescimento específico (d^{-1}) | Desvio padrão |
|------------------------------------|---|------------------|
| Controlo | 0,356 | 0,013 |
| 100% | 0,930 | 0,008 |
| 75% | 0,896 | 0,037 |
| 50% | 0,834 | 0,022 |
| 25% | 0,451 | 0,037 |

Tabela AII.6 - Valores da concentração de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) ao longo do tempo no 2º ensaio (7dias)

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|
| 1) Controlo C | 109,961 | 141,624 | 204,950 | 276,192 | 342,156 | 439,784 | 529,495 | 606,014 |
| 2) Controlo C | 99,407 | 157,455 | 210,227 | 281,469 | 342,156 | 460,892 | 489,917 | 611,291 |
| 3) Controlo C | 107,322 | 144,263 | 194,396 | 281,469 | 326,325 | 421,314 | 482,001 | 606,014 |
| 1) 12,5% C | 99,407 | 305,216 | 671,979 | 1117,899 | 1360,648 | 1606,036 | 1769,628 | 1938,498 |
| 2) 12,5% C | 107,322 | 265,637 | 592,821 | 1041,380 | 1257,744 | 1529,518 | 1656,169 | 1832,954 |
| 3) 12,5% C | 99,407 | 265,637 | 540,050 | 1038,741 | 1273,575 | 1537,433 | 1672,001 | 1912,112 |
| 1) 25% C | 146,901 | 323,686 | 669,340 | 1152,200 | 1344,817 | 1714,218 | 1906,835 | 2096,812 |
| 2) 25% C | 128,431 | 321,047 | 671,979 | 1170,671 | 1516,325 | 1827,677 | 1978,076 | 2083,620 |
| 4) 25% C | 125,792 | 371,180 | 745,859 | 1173,309 | 1455,637 | 1751,158 | 1983,353 | 2186,524 |
| 1) 25% D+C | 152,178 | 173,287 | 416,036 | 701,003 | 809,185 | 830,294 | 991,247 | 1001,801 |
| 2) 25% D+C | 131,070 | 270,914 | 645,593 | 1104,706 | 1249,828 | 1236,635 | 1278,852 | 1431,890 |
| 3) 25% D+C | 138,985 | 276,192 | 518,941 | 872,511 | 993,886 | 1067,766 | 1049,296 | 1020,271 |
| 1) 25% D+L+C | 120,515 | 154,817 | 350,072 | 524,218 | 730,027 | 790,715 | 774,883 | 846,125 |
| 2) 25% D+L+C | 131,070 | 268,276 | 582,267 | 1102,067 | 1503,132 | 1679,917 | 1664,085 | 1766,990 |
| 3) 25% D+L+C | 123,154 | 178,564 | 326,325 | 603,376 | 846,125 | 830,294 | 901,535 | 941,114 |

Tabela AII.7 - Valores do desvio padrão da concentração de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) ao longo do tempo no 2º ensaio (7dias)

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Controlo C | 5,4926 | 8,4819 | 8,0610 | 3,0468 | 9,1403 | 19,8040 | 25,4456 | 3,0468 |
| 12,5% C | 4,5702 | 22,8508 | 66,4028 | 44,9592 | 55,4102 | 42,0796 | 61,4474 | 54,9264 |
| 25% C | 11,5013 | 28,2135 | 43,4365 | 11,5013 | 86,9665 | 57,8686 | 42,7363 | 55,9935 |
| 25% D + C | 10,6637 | 47,3150 | 93,8831 | 165,4306 | 180,6738 | 166,6744 | 124,1785 | 198,5356 |
| 25% D+L+C | 5,4926 | 59,8402 | 141,4125 | 313,2808 | 416,8986 | 502,3454 | 481,0064 | 506,4724 |

Tabela AII.8 - Valores médios da concentração de clorofila a ($\mu\text{g/l}$) ao longo do tempo no 2º ensaio (7dias)

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Tempo(dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| Controlo C | 106 | 148 | 203 | 280 | 337 | 441 | 500 | 608 |
| 12,5% C | 102 | 279 | 602 | 1066 | 1297 | 1558 | 1699 | 1895 |
| 25% C | 134 | 339 | 696 | 1165 | 1439 | 1764 | 1956 | 2122 |
| 25% D + C | 141 | 240 | 527 | 893 | 1018 | 1045 | 1106 | 1151 |
| 25% D+L+C | 125 | 201 | 420 | 743 | 1026 | 1100 | 1114 | 1185 |

Tabela AII.9 - Taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* e desvio padrão no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Amostras (<i>C. vulgaris</i>) | Taxa de crescimento específico (d^{-1}) | Desvio padrão |
|------------------------------------|---|---------------|
| Controlo C | 0,248 | 0,003 |
| 12,5% C | 0,773 | 0,022 |
| 25% C | 0,716 | 0,027 |
| 25% D + C | 0,654 | 0,147 |
| 25% D+L+C | 0,731 | 0,113 |

7.3 **Anexo III** – Tabelas de valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico da *Lemna minor*

Tabela AIII.1 - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no ensaio preliminar.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | | Início | Fim | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|---------------|-------------|--------|-------|--------|---|
| 1) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 40 | 28 | 0,171996 |
| | Área foliar | 0,349 | 0,62 | 0,271 | 0,082093 |
| 2) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 35 | 23 | 0,15292 |
| | Área foliar | 0,477 | 0,778 | 0,301 | 0,069887 |
| 3) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 52 | 40 | 0,209477 |
| | Área foliar | 0,418 | 1,122 | 0,704 | 0,141055 |
| 1) 50% L | Nº Frondes | 18 | 12 | -6 | -0,05792 |
| | Área foliar | 0,386 | 0,433 | 0,047 | 0,016414 |
| 2) 50% L | Nº Frondes | 17 | 17 | 0 | 0 |
| | Área foliar | 0,459 | 0,482 | 0,023 | 0,006985 |
| 3) 50% L | Nº Frondes | 15 | 18 | 3 | 0,026046 |
| | Área foliar | 0,483 | 0,394 | -0,089 | -0,0291 |
| 4) 50% L | Nº Frondes | 12 | 16 | 4 | 0,041097 |
| | Área foliar | 0,399 | 0,669 | 0,27 | 0,073832 |
| 5) 50% L | Nº Frondes | 12 | 27 | 15 | 0,115847 |
| | Área foliar | 0,465 | 0,776 | 0,311 | 0,073159 |
| 6) 50% L | Nº Frondes | 12 | 19 | 7 | 0,065647 |
| | Área foliar | 0,434 | 0,541 | 0,107 | 0,031482 |
| | Área foliar | 0,49 | 0,739 | 0,249 | 0,058699 |

Tabela AIII.1 (continuação) - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no ensaio preliminar.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | | Início | Fim | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|-----------|-------------|--------|-------|--------|---|
| 1) 75% L | Nº Frondes | 17 | 19 | 2 | 0,015889 |
| | Área foliar | 0,495 | 0,733 | 0,238 | 0,056084 |
| 2) 75% L | Nº Frondes | 14 | 16 | 2 | 0,019076 |
| | Área foliar | 0,338 | 0,556 | 0,218 | 0,071103 |
| 3) 75% L | Nº Frondes | 12 | 12 | 0 | 0 |
| | Área foliar | 0,361 | 0,493 | 0,132 | 0,044519 |
| 4) 75% L | Nº Frondes | 17 | 15 | -2 | -0,01788 |
| | Área foliar | 0,424 | 0,584 | 0,16 | 0,045738 |
| 5) 75% L | Nº Frondes | 22 | 14 | -8 | -0,06457 |
| | Área foliar | 0,66 | 0,608 | -0,052 | -0,01172 |
| 6) 75% L | Nº Frondes | 12 | 5 | -7 | -0,12507 |
| | Área foliar | 0,331 | 0,275 | -0,056 | -0,02648 |
| 1) 100% L | Nº Frondes | 15 | 10 | -5 | -0,05792 |
| | Área foliar | 0,449 | 0,397 | -0,052 | -0,01758 |
| 2) 100% L | Nº Frondes | 15 | 12 | -3 | -0,03188 |
| | Área foliar | 0,63 | 0,759 | 0,129 | 0,026612 |
| 3) 100% L | Nº Frondes | 13 | 15 | 2 | 0,020443 |
| | Área foliar | 0,491 | 0,758 | 0,267 | 0,062034 |
| 4) 100% L | Nº Frondes | 12 | 14 | 2 | 0,022022 |
| | Área foliar | 0,502 | 0,635 | 0,133 | 0,033575 |
| 5) 100% L | Nº Frondes | 14 | 14 | 0 | 0 |
| | Área foliar | 0,438 | 0,562 | 0,124 | 0,035612 |
| 6) 100% L | Nº Frondes | 15 | 20 | 5 | 0,041097 |
| | Área foliar | 0,49 | 0,739 | 0,249 | 0,058699 |

Tabela AIII.2 - Taxa de crescimento específico média do número de frondes, da área foliar e respectivo desvio padrão, para o ensaio preliminar.

(L – *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | Taxa de crescimento específico (nº de frondes) (d ⁻¹) | Desvio padrão | Taxa de crescimento específico (área foliar) (d ⁻¹) | Desvio padrão |
|------------|---|---------------|---|---------------|
| Controlo L | 0,178 | 0,029 | 0,098 | 0,038 |
| 50% L | 0,032 | 0,059 | 0,029 | 0,040 |
| 75% L | 0 | 0,056 | 0 | 0,039 |
| 100% L | -0,029 | 0,037 | 0,030 | 0,029 |

Tabela AIII.3 - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no 1º ensaio.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | | Início 1ºEnsaio | Final 1º Ensaio | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|---------------|-------------|-----------------|-----------------|--------|---|
| 1) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 45 | 33 | 0,188822 |
| | Área foliar | 0,34 | 0,976 | 0,636 | 0,150645 |
| 2) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 50 | 38 | 0,203874 |
| | Área foliar | 0,42 | 1,241 | 0,821 | 0,154774 |
| 3) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 57 | 45 | 0,222592 |
| | Área foliar | 0,334 | 1,119 | 0,785 | 0,172721 |
| 1) 100% L | Nº Frondes | 12 | 11 | -1 | -0,01243 |
| | Área foliar | 0,336 | 0,375 | 0,039 | 0,015688 |
| 2) 100% L | Nº Frondes | 12 | 12 | 0 | 0 |
| | Área foliar | 0,33 | 0,366 | 0,036 | 0,014792 |
| 3) 100% L | Nº Frondes | 12 | 10 | -2 | -0,02605 |
| | Área foliar | 0,337 | 0,248 | -0,089 | -0,04381 |
| 1) 75% L | Nº Frondes | 12 | 8 | -4 | -0,05792 |
| | Área foliar | 0,311 | 0,189 | -0,122 | -0,07115 |
| 2) 75% L | Nº Frondes | 12 | 23 | 11 | 0,092941 |
| | Área foliar | 0,383 | 0,768 | 0,385 | 0,099394 |
| 3) 75% L | Nº Frondes | 12 | 9 | -3 | -0,0411 |
| | Área foliar | 0,385 | 0,339 | -0,046 | -0,01818 |

Tabela AIII.3 (continuação) - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no 1º ensaio.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | | Início 1ºEnsaio | Final 1º Ensaio | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|----------|-------------|-----------------|-----------------|-------|---|
| 1) 50% L | Nº Frondes | 12 | 26 | 14 | 0,110456 |
| | Área foliar | 0,263 | 0,55 | 0,287 | 0,105395 |
| 2) 50% L | Nº Frondes | 12 | 17 | 5 | 0,049758 |
| | Área foliar | 0,336 | 0,564 | 0,228 | 0,073992 |
| 3) 50% L | Nº Frondes | 12 | 23 | 11 | 0,092941 |
| | Área foliar | 0,382 | 0,964 | 0,582 | 0,132239 |
| 1) 25% L | Nº Frondes | 12 | 53 | 41 | 0,212198 |
| | Área foliar | 0,316 | 1,409 | 1,093 | 0,213556 |
| 2) 25% L | Nº Frondes | 16 | 37 | 21 | 0,119761 |
| | Área foliar | 0,386 | 0,819 | 0,433 | 0,107464 |
| 3) 25% L | Nº Frondes | 12 | 27 | 15 | 0,115847 |
| | Área foliar | 0,254 | 0,648 | 0,394 | 0,133794 |

Tabela AIII.4 - Taxa de crescimento específico média do número de frondes, da área foliar e respectivo desvio padrão, para o 1º ensaio.

(L – *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| | Taxa de crescimento específico (nº de frondes) (d ⁻¹) | Desvio padrão | Taxa de crescimento específico (área foliar) (d ⁻¹) | Desvio padrão |
|------------|---|---------------|---|---------------|
| Controlo L | 0,205 | 0,017 | 0,159 | 0,012 |
| 25% L | 0,149 | 0,054 | 0,152 | 0,055 |
| 50% L | 0,084 | 0,031 | 0,104 | 0,029 |
| 75% L | -0,002 | 0,082 | 0,003 | 0,087 |
| 100% L | -0,013 | 0,013 | -0,004 | 0,034 |

Tabela AIII.5 - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | | Início 2ºEnsaio | Final 2º Ensaio | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|---------------|-------------|-----------------|-----------------|-------|---|
| 1) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 79 | 67 | 0,269220172 |
| | Área foliar | 0,363 | 3,086 | 2,723 | 0,305746886 |
| 2) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 105 | 93 | 0,309864814 |
| | Área foliar | 0,412 | 4,34 | 3,928 | 0,336372325 |
| 3) Controlo L | Nº Frondes | 12 | 100 | 88 | 0,302894791 |
| | Área foliar | 0,364 | 3,343 | 2,979 | 0,316781431 |
| 1) 12,5% L | Nº Frondes | 12 | 81 | 69 | 0,272791786 |
| | Área foliar | 0,342 | 2,462 | 2,12 | 0,281988367 |
| 2) 12,5% L | Nº Frondes | 12 | 71 | 59 | 0,253967604 |
| | Área foliar | 0,334 | 2,14 | 1,806 | 0,265345731 |
| 3) 12,5% L | Nº Frondes | 12 | 56 | 44 | 0,220063577 |
| | Área foliar | 0,386 | 1,731 | 1,345 | 0,214373884 |
| 1) 25% L | Nº Frondes | 12 | 44 | 32 | 0,185611855 |
| | Área foliar | 0,383 | 1,178 | 0,795 | 0,160505482 |
| 2) 25% L | Nº Frondes | 12 | 37 | 25 | 0,160858752 |
| | Área foliar | 0,436 | 1,081 | 0,645 | 0,129714225 |
| 3) 25% L | Nº Frondes | 12 | 45 | 33 | 0,188822263 |
| | Área foliar | 0,398 | 1,263 | 0,865 | 0,164970445 |

Tabela AIII.5 (continuação) - Valores para o número de frondes e área foliar inicial e final, e respetivos yields e taxas de crescimento específico no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | | Início 2ºEnsaio | Final 2º Ensaio | Yield | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) |
|--------------|-------------|-----------------|-----------------|-------|---|
| 1) 25% D+L | Nº Frondes | 12 | 62 | 50 | 0,234603962 |
| | Área foliar | 0,437 | 2,127 | 1,69 | 0,226076374 |
| 2) 25% D+L | Nº Frondes | 12 | 43 | 31 | 0,182327638 |
| | Área foliar | 0,421 | 1,166 | 0,745 | 0,14552879 |
| 3) 25% D+L | Nº Frondes | 12 | 46 | 34 | 0,191962107 |
| | Área foliar | 0,418 | 1,387 | 0,969 | 0,171345284 |
| 1) 25% D+L+C | Nº Frondes | 12 | 61 | 49 | 0,232281031 |
| | Área foliar | 0,424 | 1,366 | 0,942 | 0,167129798 |
| 2) 25% D+L+C | Nº Frondes | 12 | 48 | 36 | 0,198042052 |
| | Área foliar | 0,393 | 1,098 | 0,705 | 0,146776573 |
| 3) 25% D+L+C | Nº Frondes | 12 | 72 | 60 | 0,255965638 |
| | Área foliar | 0,493 | 1,659 | 1,166 | 0,173351588 |

Tabela AIII.6 - Taxa de crescimento específico média do número de frondes, da área foliar e respectivo desvio padrão, para o 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | Taxa de crescimento específico (nº de frondes) (d ⁻¹) | Desvio padrão | Taxa de crescimento específico (área foliar) (d ⁻¹) | Desvio padrão |
|------------|---|---------------|---|---------------|
| Controlo L | 0,294 | 0,021 | 0,320 | 0,015 |
| 12,5% L | 0,249 | 0,027 | 0,254 | 0,035 |
| 25% L | 0,178 | 0,015 | 0,152 | 0,019 |
| 25% D+L | 0,203 | 0,028 | 0,181 | 0,041 |
| 25% D+L+C | 0,229 | 0,029 | 0,162 | 0,014 |

7.4 **Anexo IV** – Tabelas de valores para a temperatura, pH, absorvência, nº de *Daphnia* e taxas de crescimento específico da *Daphnia*

Tabela AIV.1 - Variação da temperatura ao fim de 7 dias para o ensaio preliminar.

| 15/7/2019 | 16/7/2019 | 17/7/2019 | 18/7/2019 | 19/7/2019 | 20/7/2019 | 21/7/2019 | 22/7/2019 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 24,9 °C | 23,4 °C | 24,3 °C | 23,1 °C | 23 °C | 23,6 °C | 23,9 °C | 24,3 °C |

Tabela AIV.2 - Valores médios obtidos para o pH da *L. minor* no ensaio preliminar.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 3 | 7 |
|--------------|-----|-----|------|
| Controlo L | 7,4 | 5,7 | 5,5 |
| 50% L | 7,6 | 8,6 | 10,2 |
| 75% L | 7,6 | 8,6 | 10,3 |
| 100% L | 7,7 | 8,6 | 9,7 |

Tabela AIV.3 - Variação da temperatura ao fim de 7 dias para o 1º ensaio.

| 4/10/2019 | 5/10/2019 | 6/10/2019 | 7/10/2019 | 8/10/2019 | 9/10/2019 | 10/10/2019 | 11/10/2019 |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|
| 24,4 °C | 25 °C | 24,9 °C | 24,5 °C | 24,8 °C | 24 °C | 23,6 °C | 23,9 °C |

Tabela AIV.4 - Valores médios obtidos para o pH da *L. minor* no 1º ensaio.

(L- *Lemna*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 4 | 7 |
|--------------|-----|------|-----|
| Controlo L | 7,5 | 5,2 | 5,4 |
| 25% L | 7,4 | 10,3 | 9,5 |
| 50% L | 7,5 | 10,0 | 9,9 |
| 75% L | 7,6 | 9,8 | 9,9 |
| 100% L | 7,5 | 9,5 | 9,6 |

Tabela AIV.5 - Valores médios obtidos para o pH da *C. vulgaris* no 1º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 3 | 4,5 | 7 |
|--------------|-----|------|------|------|
| Controlo C | 7,4 | 8,8 | 8,0 | 7,2 |
| 25% C | 8,0 | 10,3 | 10,2 | 10,0 |
| 50% C | 7,9 | 10,2 | 10,5 | 10,3 |
| 75% C | 8,0 | 10,0 | 10,1 | 10,4 |
| 100% C | 7,9 | 7,1 | 10,1 | 10,6 |

Tabela AIV.6 - Valores médios obtidos para as absorvências no 1º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Controlo C | 0,041 | 0,068 | 0,109 | 0,140 | 0,163 | 0,323 | 0,170 | 0,168 |
| 25% C | 0,048 | 0,143 | 0,231 | 0,292 | 0,385 | 0,528 | 0,675 | 0,605 |
| 50% C | 0,057 | 0,141 | 0,221 | 0,207 | 0,203 | 0,247 | 0,328 | 0,378 |
| 75% C | 0,063 | 0,159 | 0,288 | 0,260 | 0,235 | 0,213 | 0,237 | 0,286 |
| 100% C | 0,067 | 0,171 | 0,330 | 0,321 | 0,292 | 0,225 | 0,288 | 0,365 |

Tabela AIV.7 - Variação da temperatura ao fim de 7 dias para o 2º ensaio.

| 8/11/2019 | 9/11/2019 | 10/11/2019 | 11/11/2019 | 12/11/2019 | 13/11/2019 | 14/11/2019 | 15/11/2019 |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 22,5 °C | 21,3 °C | 21,4 °C | 21,3 °C | 21,1 °C | 21,3 °C | 21,2 °C | 20,04 °C |

Tabela AIV.8 - Valores médios obtidos para o pH no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 3 | 5 | 7 |
|--------------|-----|------|-----|------|
| Controlo L | 5,3 | 5,7 | 6,8 | 8,3 |
| 12,5% L | 7,4 | 8,1 | 9,0 | 8,8 |
| 25% L | 7,4 | 8,2 | 9,1 | 9,8 |
| Controlo C | 6,1 | 7,1 | 7,2 | 7,7 |
| 12,5% C | 7,4 | 9,9 | 9,5 | 9,7 |
| 25% C | 7,4 | 10,2 | 9,8 | 10,1 |
| 25% D | 7,4 | 8,4 | 8,4 | 8,8 |
| 25% D+C | 7,4 | 10,1 | 9,7 | 9,8 |
| 25% D+L | 7,4 | 8,5 | 9,2 | 9,8 |
| 25% D+L+C | 7,4 | 10,1 | 9,8 | 10,1 |

Tabela AIV.9 - Valores médios obtidos para as absorvências no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Tempo (dias) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Controlo C | 0,058 | 0,074 | 0,095 | 0,124 | 0,146 | 0,185 | 0,208 | 0,249 |
| 15% C | 0,057 | 0,124 | 0,246 | 0,422 | 0,510 | 0,609 | 0,662 | 0,736 |
| 25% C | 0,069 | 0,147 | 0,282 | 0,460 | 0,564 | 0,687 | 0,760 | 0,823 |
| 25% D+C | 0,072 | 0,109 | 0,218 | 0,357 | 0,404 | 0,414 | 0,438 | 0,455 |
| 25% D+L+C | 0,066 | 0,094 | 0,177 | 0,300 | 0,407 | 0,435 | 0,440 | 0,467 |

Tabela AIV.10 - Número de *Daphnia*(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Data | 8/11/2019 | 13/11/2019 | 15/11/2019 |
|--------------|-----------|------------|------------|
| Tempo (dias) | 0 | 5 | 7 |
| Controlo D | 10 | 0 | 0 |
| Controlo D | 10 | 16 | 25 |
| Controlo D | 10 | 18 | 22 |
| Média | 10 | 11 | 16 |
| 25% D+C | 12 | 10 | 12 |
| 25% D+C | 10 | 6 | 6 |
| 25% D+C | 10 | 7 | 12 |
| Média | 11 | 8 | 10 |
| 25% D+L | 10 | 5 | 11 |
| 25% D+L | 10 | 6 | 14 |
| 25% D+L | 10 | 3 | 4 |
| Média | 10 | 5 | 10 |
| 25% D+L+C | 10 | 13 | 31 |
| 25% D+L+C | 10 | 1 | 4 |
| 25% D+L+C | 10 | 14 | 19 |
| Média | 10 | 9 | 18 |

Tabela AIV.11 - Taxa de crescimento específico de *Daphnia* e desvio padrão.(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| Amostras | Taxa de crescimento específico (d ⁻¹) | Desvio padrão |
|-----------|---|---------------|
| 25% D | 0,066 | 0,262 |
| 25% D+C | -0,009 | 0,053 |
| 25% D+L | -0,005 | 0,097 |
| 25% D+L+C | 0,086 | 0,156 |

7.5 **Anexo V** – Tabela de valores para a concentração de fósforo total e azoto total no final do ensaio preliminar

Tabela AV.1 - Valores obtidos para as concentrações de fósforo total (P total) e azoto total (N total) nas concentrações de água residual de 25%,50%,75% e 100%.

| | P total (mg P/l) | N total (mg N/l) |
|------|---------------------|---------------------|
| 25% | 0,25 | 17 |
| 50% | 0,37 | 35 |
| 75% | 0,54 | — |
| 100% | 0,49 | 31 |

7.6 **Anexo VI** – Tabela de valores para a caracterização do efluente final (SIMARSUL 2019)

Tabela AVI.1 - Caracterização do efluente final para os três ensaios

| Ensaio | Dia | pH | P Total (mg P/l) | N Total (mg N/l) |
|------------|---------|-----|---------------------|---------------------|
| Preliminar | 18/7/19 | 7,5 | 3,8 | 54 |
| 1º | 3/10/19 | 7,5 | 8,7 | 44 |
| 2º | 7/11/19 | 7,7 | 1,8 | 17 |

7.7 Anexo VII – Tabelas de valores obtidos no software R para o teste de Tukey

Tabela AVII.1 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico do nº de frondes para a *Lemna minor* no 1º ensaio.

(% - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | Upr | p adj |
|--------------|-------------|--------------|-------------|-----------|
| 25%-100% | 0,16209417 | 0,034683765 | 0,28950458 | 0,0125724 |
| 50%-100% | 0,09721034 | -0,030200070 | 0,22462074 | 0,1637756 |
| 75%-100% | 0,01079873 | -0,116611677 | 0,13820914 | 0,9984351 |
| Controlo-100 | 0,21792142 | 0,090511010 | 0,34533182 | 0,0015834 |
| 50%-25% | -0,06488383 | -0,192294242 | 0,06252657 | 0,4877496 |
| 75%-25% | -0,15129544 | -0,278705849 | -0,02388504 | 0,0192386 |
| Controlo-25% | 0,05582724 | -0,071583162 | 0,18323765 | 0,6173207 |
| 75%-50% | -0,08641161 | -0,213822015 | 0,04099880 | 0,2435196 |
| Controlo-50% | 0,12071108 | -0,006699328 | 0,24812149 | 0,0653765 |
| Controlo-75% | 0,20712269 | 0,079712280 | 0,33453309 | 0,0023195 |

Tabela AVII.2 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico da área foliar para a *Lemna minor* no 1º ensaio.

(% - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | Upr | p adj |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| 25%-100% | 0,156047385 | 0,01997607 | 0,29211869 | 0,0236392 |
| 50%-100% | 0,108317936 | -0,02775337 | 0,24438925 | 0,1395103 |
| 75%-100% | 0,007798298 | -0,12827301 | 0,14386961 | 0,9996638 |
| Controlo100% | 0,163823019 | 0,02775171 | 0,29989433 | 0,0177028 |
| 50%-25% | -0,04772944 | -0,18380076 | 0,08834186 | 0,7755657 |
| 75%-25% | -0,14824908 | -0,28432040 | -0,01217778 | 0,0316498 |
| Controlo-25% | 0,007775634 | -0,12829568 | 0,14384694 | 0,9996676 |
| 75%-50% | -0,10051964 | -0,23659095 | 0,03555167 | 0,1838784 |
| Controlo-50% | 0,055505083 | -0,08056623 | 0,19157639 | 0,6735725 |
| Controlo-75% | 0,156024721 | 0,01995341 | 0,29209603 | 0,0236592 |

Tabela AVII.3 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* no 1º ensaio.

(% - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | Upr | p adj |
|---------------|----------|----------|----------|--------|
| 25%-100% | -0,4792 | -0,54978 | -0,40862 | 0,0000 |
| 50%-100% | -0,0961 | -0,16668 | -0,02552 | 0,0081 |
| 75%-100% | -0,0338 | -0,10438 | 0,036776 | 0,5420 |
| Controlo-100% | -0,57337 | -0,64394 | -0,50279 | 0,0000 |
| 50%-25% | 0,3831 | 0,312524 | 0,453676 | 0,0000 |
| 75%-25% | 0,4454 | 0,374824 | 0,515976 | 0,0000 |
| Controlo-25% | -0,09417 | -0,16474 | -0,02359 | 0,0092 |
| 75%-50% | 0,0623 | -0,00828 | 0,132876 | 0,0907 |
| Controlo-50% | -0,47727 | -0,54784 | -0,40669 | 0,0000 |
| Controlo-75% | -0,53957 | -0,61014 | -0,46899 | 0,0000 |

Tabela AVII.4 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico do nº de frondes para a *Lemna minor* no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | upr | p adj |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| 25% D+L-12,5% L | -0,04598 | -0,11226 | 0,020312 | 0,227025 |
| 25% D+L+C-12,5% L | -0,02018 | -0,08647 | 0,04611 | 0,848845 |
| 25% L-12,5% L | -0,07051 | -0,1368 | -0,00422 | 0,036108 |
| Controlo-12,5% L | 0,045052 | -0,02124 | 0,11134 | 0,241946 |
| 25% D+L+C-25% D+L | 0,025798 | -0,04049 | 0,092086 | 0,707903 |
| 25% L-25% D+L | -0,02453 | -0,09082 | 0,041754 | 0,742091 |
| Controlo-25% D+L | 0,091029 | 0,024741 | 0,157317 | 0,00764 |
| 25% L-25% D+L+C | -0,05033 | -0,11662 | 0,015956 | 0,166696 |
| Controlo-25% D+L+C | 0,06523 | -0,00106 | 0,131518 | 0,054245 |
| Controlo-25% L | 0,115562 | 0,049274 | 0,18185 | 0,001369 |

Tabela AVII.5 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico da área foliar para a *Lemna minor* no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | upr | p adj |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| 25% D+L-12,5% L | -0,07292 | -0,14636 | 0,000525 | 0,051859 |
| 25% D+L+C-12,5% L | -0,09148 | -0,16493 | -0,01804 | 0,014359 |
| 25% L-12,5% L | -0,10217 | -0,17562 | -0,02873 | 0,007002 |
| Controlo-12,5% L | 0,065731 | -0,00771 | 0,139175 | 0,085279 |
| 25% D+L+C-25 %D+L | -0,01856 | -0,09201 | 0,05488 | 0,914614 |
| 25% L-25% D+L | -0,02925 | -0,1027 | 0,044191 | 0,691254 |
| Controlo-25% D+L | 0,13865 | 0,065206 | 0,212094 | 0,000734 |
| 25% L-25% D+L+C | -0,01069 | -0,08413 | 0,062755 | 0,987637 |
| Controlo-25% D+L+C | 0,157214 | 0,08377 | 0,230658 | 0,000264 |
| Controlo-25% L | 0,167904 | 0,094459 | 0,241348 | 0,000152 |

Tabela AVII.6 - Resultados do teste de Tukey para a taxa de crescimento específico da *C. vulgaris* no 2º ensaio.

(C– *Chlorella vulgaris*; D- *Daphnia magna*; L- *Lemna minor*; % - Concentração de água residual)

| | Diff | Lwr | upr | p adj |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| 25% C-12,5% C | -0,05767 | -0,28497 | 0,169637 | 0,913598 |
| 25% D+C-12,5% | -0,119 | -0,3463 | 0,108303 | 0,463019 |
| 25% D+L+C-12,5% C | -0,042 | -0,2693 | 0,185303 | 0,970538 |
| Controlo-12,5% C | -0,52533 | -0,75264 | -0,29803 | 0,000138 |
| 25% D+C-25% C | -0,06133 | -0,28864 | 0,16597 | 0,894996 |
| 25% D+L+C-25% C | 0,015667 | -0,21164 | 0,24297 | 0,999304 |
| Controlo-25% C | -0,46767 | -0,69497 | -0,24036 | 0,000366 |
| 25% D+L+C-25% D+C | 0,077 | -0,1503 | 0,304303 | 0,795603 |
| Controlo-25% D+C | -0,40633 | -0,63364 | -0,17903 | 0,001128 |
| Controlo-25% D+L+C | -0,48333 | -0,71064 | -0,25603 | 0,000279 |

7.8 Anexo VIII – Script utilizado no software R para a análise estatística

```
# Este código vai abrir uma janela para se escolher o ficheiro de trabalho
Teste1f<- read.csv(file.choose(),header = TRUE, sep = ",")

# Este código torna as variáveis acessíveis apenas digitando o nome destas na linha de
comandos
attach(Teste1f)

# Este código verifica que é uma variável categórica
is.factor(amostra)

# Este código cria um gráfico de caixa de bigodes que vai permitir detetar a presença de outliers
boxplot(taxa~amostra, main="Fig.-1: Boxplot de 5 amostras", col= rainbow(5))

# Este código permite ajustar o modelo ANOVA aos dados através da função aov() no R

model1<- aov(taxa~amostra)

# Este código permite obter os resultados da ANOVA (fator único)
summary(model1)

# Este código efetua o teste de Tukey para um nível de confiança de 95%
TukeyHSD(model1, conf.level = 0.95)

# Este código permite alterar as dimensões das margens do gráfico
par(mar = c(4, 7, 2, 2))

# Este código cria um gráfico para os resultados do teste de Tukey
plot(TukeyHSD(model1, conf.level = 0.95),las=1, col = "red",cex.axis=0.7)
```